

FERROMAGNETISCHE TRÄGERERYTHROZYTEN:

Grundlegende In-vitro-Studien über einen potentiellen
biologischen Träger für Pharmaka bei der gezielten,
organspezifischen Chemotherapie maligner Tumoren

DIERK-JOACHIM LANZ

1986

*Diss
München
1986*

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner

Ferromagnetische Trägererythrozyten:

Grundlegende In-vitro-Studien über einen potentiellen
biologischen Träger für Pharmaka bei der gezielten,
organspezifischen Chemotherapie maligner Tumoren.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dierk - Joachim Lanz

aus

Ingolstadt

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Sprandel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 04. 1986

"Wir fühlen, daß selbst, wenn alle möglichen wissenschaftlichen Fragen beantwortet sind, unsere Lebensprobleme oft noch gar nicht berührt sind."

(Ludwig Wittgenstein)

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. EINSCHLUSS VON "FERROFLUIDS" IN ERYTHROZYTEN - GRUNDLAGEN DER METHODIK UND VERSUCHE ZUR STANDARDISIERUNG UND OPTIMIERUNG DES PRÄPARATIONSABLAUFES BEI DER HERSTELLUNG FERROMAGNETISCHER TRÄGERERYTHROZYTEN	6
2.1. MATERIALIEN	6
2.1.1. Erythrozyten	6
2.1.2. Pufferlösungen	6
2.1.3. Chemikalien für die Rasterelektronenmikroskopie	6
2.1.4. Chemikalien zur Hämoglobinbestimmung	7
2.1.5. Ferrofluids	7
2.1.6. Geräte	8
2.1.6.1. Präparation der Trägererythrozyten	8
2.1.6.2. Suszeptibilitätsmessung	9
2.1.6.3. Rasterelektronenmikroskopie	9
2.1.6.4. Hämoglobinbestimmung	9
2.1.6.5. Zellzählung	9
2.1.6.6. Magnet	9
2.2. METHODEN	10
2.2.1. Das Verfahren der hypoosmolaren Dialyse zur Herstellung von Trägererythrozyten	10
2.2.2. Suszeptibilitätsmessungen als Methode zur Bestimmung der Beladungsrate von Trägererythrozyten mit ferromagnetischen Makromolekülen	16
2.2.2.1. Allgemeine Vorbemerkungen	16
2.2.2.2. Physikalische Grundlagen	18
2.2.2.3. Versuchsanordnung zur Suszeptibilitätsmessung	22
2.2.3. Herstellung von Präparaten für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Untersuchung der Morphologie von Trägererythrozyten	26

2.2.4. Orientierende Vorversuche über die Eigenschaften der Ferrofluids	27
2.2.4.1. Löslichkeitsverhalten von Ferrofluids in verschiedenen Medien	27
2.2.4.2. Verhalten von unverdünnten und von in Puffer I verdünnten Ferrofluids im Magnetfeld	27
2.2.4.3. Suszeptibilitätsmessungen von reinen Ferrofluids und Aufstellung einer standardisierten Eichkurve zur Ermittlung unbekannter Ferrofluidverdünnungen	27
2.2.4.4. Untersuchung der Ferrofluids vor und nach Ultraschall	28
2.2.4.5. Chemische Analyse der Ferrofluids	29
2.2.5. Versuchsreihen zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Beladungsrate von Trägererythrozyten	29
2.2.5.1. Magnetische Eigenschaften unbehandelter Erythrozyten	29
2.2.5.2. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Art der eingesetzten Ferrofluids	29
2.2.5.3. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Dauer der Ultraschallbehandlung der Ferrofluids sowie der Frequenz des eingesetzten Ultraschalls	29
2.2.5.4. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Konzentration der im Außenmedium angebotenen Ferrofluids	30
2.2.5.5. Abhängigkeit der Beladungsrate vom Hämatokrit des Präparationsansatzes	30
2.2.5.6. Abhängigkeit der Beladungsrate von weiteren Parametern	30
2.2.6. Statistische Betrachtungen	31
2.2.6.1. Fehlerberücksichtigung bei der Auswertung von Meßergebnissen	31
2.2.6.2. Statistische Überlegungen bei der Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Morphologiestudien	31
2.2.6.3. Anwendung des "Student-Tests" auf die Ergebnisse des In-vitro-Kreislaufmodells (Kapitel 4) zur Untersuchung der magnetischen Beeinflussbarkeit von Trägererythrozyten ..	32
2.3. ERGEBNISSE	33
2.3.1. Eigenschaften der Ferrofluids	33
2.3.1.1. Löslichkeitsverhalten von Ferrofluids in verschiedenen Medien	33
2.3.1.2. Verhalten der Ferrofluids im Magnetfeld	34
2.3.1.3. Suszeptibilitätsmessungen und Aufstellen einer standardisierten Eichkurve für eine Verdünnungsreihe von Ferrofluids in Puffer I	35

2.3.1.4. Ergebnisse der Ultraschallung von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)	39
2.3.1.5. Einfluß von Inhaltsstoffen der Erythrozyten auf die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids	42
2.3.1.6. Chemische Analyse der Ferrofluids	44
2.3.2. Einfluß verschiedener Parameter auf die Beladungsrate der Trägererythrozyten	45
2.3.2.1. Magnetische Eigenschaften unbeladener Erythrozyten und Suszeptibilitäten verschiedener Leerproben	45
2.3.2.2. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Art der eingesetzten Ferrofluids	47
2.3.2.3. Abhängigkeit der Beladungsrate von Dauer und Frequenz der Ferrofluid -Ultraschallung	49
2.3.2.4. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Konzentration der im Außenmedium angebotenen Ferrofluids	51
2.3.2.5. Abhängigkeit der Beladungsrate vom Hämatokrit des Präparationsansatzes in den Dialyseschläuchen	53
2.3.2.6. Abhängigkeit der Beladungsrate von weiteren Parametern ...	53
2.3.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie von mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten	55
2.3.3.1. Methodische Vorbemerkungen	55
2.3.3.2. Morphologie der gemäß standardisierter Präparationsmethode hergestellten Trägererythrozyten	55
2.3.3.3. Einflüsse verschiedener Parameter auf die morphologischen Veränderungen bei ferromagnetischen Trägererythrozyten	62
3. VERLUST DER FERROMAGNETISCHEN EIGENSCHAFTEN VON TRÄGERERYTHROZYTEN NACH ABSCHLUSS DES PRÄPARATIONSVORGANGS	65
3.1. MATERIALIEN	65
3.2. METHODEN	65
3.2.1. Versuchsanordnung zur qualitativen und quantitativen Ermittlung der Verlustrate an Ferrofluids aus Trägererythrozyten	65

3.2.2. Beschreibung der verwendeten Hilfsmethoden	68
3.2.2.1. Zellzählung	68
3.2.2.2. Hämoglobinbestimmung	69
3.2.2.3. Suszeptibilitätsmessungen	69
3.3. ERGEBNISSE	70
 4. BEEINFLUSSBARKEIT FERROMAGNETISCHER TRÄGERERYTHROZYTEN MITTELS STARKER ÄUSSERER MAGNETFELDER IM IN-VITRO- KREISLAUFMODELL	 81
4.1. MATERIALIEN	81
4.2. METHODEN	81
4.2.1. Orientierender Vorversuch zur generellen Beeinfluß- barkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder	 81
4.2.2. Aufbau des In-vitro-Kreislaufmodells	82
4.2.3. Versuchsablauf bei den beiden Kreislaufmodellen	85
4.2.4. Auswertung der Kreislaufversuche	86
4.3. ERGEBNISSE	87
4.3.1. Orientierender Vorversuch zur Beeinflußbarkeit ferro- magnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnet- felder	 87
4.3.2. Probegedurchlauf der Kreislaufmodelle I und II mit reinen Ferrofluids	 88
4.3.2.1. Kreislaufmodell I	88
4.3.2.2. Kreislaufmodell II	89
4.3.3. Beeinflußbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder im Kreislaufmodell I	 89
4.3.4. Beeinflußbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder im Kreislaufmodell II	 92

5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION ALLER ERGEBNISSE — ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN	93
6. LITERATURVERZEICHNIS	97
DANKSAGUNGEN	107
LEBENS LAUF	108

1. EINLEITUNG

Als die Medizin nach der Einführung hochpotenter zytotoxischer Pharmaka in die Krebstherapie mit den enormen Nebenwirkungen dieser Medikamente auf gesunde Zellen bei systemischer Gabe konfrontiert wurde, und als erste immunologische Zwischenfälle bei der Substitutionstherapie von angeborenen Stoffwechselkrankheiten mit Hilfe artfremder Enzyme aufgetreten waren, wurde bald der Ruf nach biologischen Trägersystemen laut, die es ermöglichen sollten, bestimmte Makromoleküle wie Enzyme oder Pharmaka geschützt vor dem Zugriff körpereigener Abwehrmechanismen und Abbauprozesse via Blutbahn an den Ort ihrer Wirkung zu transportieren, um sie erst dort und ausschließlich dort freizusetzen. Kenneth W i d d e r zeichnet im Vorwort zu einer seiner Arbeiten ([75]) das Bild eines solchen idealen biologischen "Carriers": er sollte zunächst die Verteilung des Medikaments oder zumindest seine Effekte auf ein bestimmtes Gewebe oder ein Zielorgan beschränken. Des weiteren müßte er längere Zeit im Sinne einer Reservoirfunktion Einfluß auf die Lokalisation der Droge behalten und ihr trotzdem einen raschen Zugang zum Organparenchym ermöglichen. Er müßte eine kontrollierbare und vorhersagbare Menge des Pharmakons zur Verfügung stellen, über eine weitgestreute Transportkapazität verfügen, ausreichend große Mengen von Pharmaka transportieren können (um die Menge des Trägers möglichst gering zu halten!) und alle zu transportierenden Substanzen aufnehmen und wieder abgeben, ohne dabei ihre biologische Aktivität zu beeinflussen. Für die Dauer des Transportes wäre schließlich eine minimale Abgabe des Pharmakons vom Träger ins Plasma zu fordern, um einen raschen Abbau und das Auftreten von allergischen Reaktionen oder toxischen Nebenwirkungen weitgehend zu verhindern. Der Träger sollte außerdem biologisch abbaubar und leicht herzustellen sein, und er sollte selbst keine oder nur sehr geringe Nebenwirkungen aufweisen.

Im Laufe der Zeit wurden die verschiedensten körpereigenen und künstlichen Transportvehikel vorgeschlagen: Ihler([26]), Zimmermann([77],[78],[79]), Fiddler([18]), Tyrrell([71]) und einige andere Forscher waren die ersten, die mit Erythrozytenschatten

arbeiteten. Knudson et al. hatten schon 1971 den Leukozyten als Träger entdeckt ([35]), Matas experimentierte mit Hepatozyten ([43]). Gregoriadis und Ryman ([20], [21], [22]), Neerunjun ([48]) und Papahadjopoulos ([51]) wurden zu Vorreitern der Liposomen als "Biocarrier"; Rhodes ([54]), Buchanan ([9]), Sanyei und Widder ([58], [73], [74]) propagierten Albumin-Mikrosphären, ein Transportsystem, welches in letzter Zeit ganz erheblich an Bedeutung gewonnen hat und inzwischen beachtliche Erfolge aufweisen kann. Schließlich ließ man auch einige synthetische Makromoleküle als Transportvehikel für Pharmaka nicht unversucht. Es würde zu weit führen, an dieser Stelle auf jeden einzelnen der verschiedenen Träger sowie seine Vor- und Nachteile hinsichtlich Herstellung, Applikation und Nebenwirkungen näher einzugehen. Bezüglich solcher Details sei auf die jeweiligen Originalarbeiten und die bereits zitierte Schrift von Widder ([75]) verwiesen. Ich werde mich hier auf die genauere Darstellung der Erythrozytenschatten als der von mir verwendeten Methode beschränken.

Einen idealen "Carrier", der in allem den oben aufgeführten Ansprüchen Widders gerecht würde, gibt es bis heute nicht. Doch haben sich die Erythrozytenschatten (im englischen Schrifttum als "erythrocyte ghosts" bezeichnet) und ihre Weiterentwicklung, die sogenannten Trägererythrozyten (nach Sprandel 1980, [64]/[68]) als eine dem Ideal sehr nahe kommende Lösung erwiesen.

Schon Ponder hatte 1948 darauf hingewiesen ([52]), daß es möglich sei, Erythrozytenmembranen durch direkte hypoosmolare Hämolyse reversibel zu eröffnen und die Zellen in diesem Zustand mit verschiedenen Substanzen, die im Außenmedium in hoher Konzentration vorhanden waren, zu beladen. Dabei gingen zunächst aber viele Inhaltsstoffe des Erythrozyten, wie der Glykolyse-Enzymesatz, Hämoglobin, ATP und andere wichtige Substanzen beinahe vollständig verloren. Man erhielt mehr oder weniger leere Erythrozytenhüllen, weswegen man bildlich auch von "erythrocyte ghosts" sprach.

Im Gegensatz zu den durch direkte Hämolyse von Ihler ([26]) oder durch das dielektrische Durchbruchverfahren von Zimmermann ([77], [78], [79]) gewonnenen Erythrozytenschatten ist es heute mit Hilfe des sehr schonenden hypoosmolaren Dialyse-

verfahrens nach Dale ([10]), DeLoach ([11]) und Sprandel ([61]) möglich, Erythrozytenschatten herzustellen, die praktisch normalen, unbehandelten roten Blutkörperchen entsprechen: Die Überlebenszeit in vivo beträgt zwischen 60 und 100 Tagen (bei unbehandelten Erythrozyten 120 Tage), je nachdem, ob dem Dialysepuffer noch Glucose, Adenosin und $MgCl_2$ zugesetzt werden oder nicht ([64], auch [13]). Morphologisch betrachtet erhält man bei schonender Dialyse mit angereichertem Puffer über 80 % normale bikonkave Zellen ([66]). Der Verlust an erythrozyteneigenen Substanzen beträgt weniger als 30 % ([65]), alle wichtigen Transportmechanismen der Erythrozytenmembran bleiben weitgehend unbeeinflusst, so diejenigen für Glucose, Natrium, Phosphat, organische Säuren, Aminosäuren und andere Stoffe ([24], [61], [62], [63], [65], [69], [72]). Auch die Einschlußrate für angebotene Substanzen liegt bei der Dialyse weit höher als bei den anderen Methoden und erreicht 40 % und mehr ([10]). Das Spektrum der bereits erfolgreich eingeschlossenen Moleküle ist weit gefächert und umfaßt neben zahlreichen Enzymen ([11], [26], [27]), Ferritin ([3]), kolloidalem Gold ([57]), Albumin ([10], [61]) und RNA ([7], [8], [56]) in neuerer Zeit auch Pestizide ([12]) und einige Zytostatika wie Methotrexat, Bleomycin, Actinomycin D oder Cytosin-Arabinosid ([14], [15], [42]). Damit sind die Erythrozytenschatten bzw. Trägererythrozyten auf dem besten Weg, in absehbarer Zeit als ideale "Carrier" für antineoplastische Medikamente bei der gezielten Tumorthherapie eingesetzt zu werden; denn man reduziert dadurch nicht bloß die unliebsamen Nebenwirkungen der Medikamente, sondern vermeidet auch weitgehend allergische Reaktionen, wenn man dem Patienten seine eigenen Erythrozyten nach entsprechender Präparation wieder zuführen kann, was einer autologen Transplantation mit dem bekannt geringen Risiko entspricht. Einen guten zusammenfassenden Überblick über den gegenwärtigen Stand der Ergebnisse bei den Arbeiten mit Erythrozytenschatten/Trägererythrozyten bieten die erst kürzlich erschienenen Bücher von DeLoach und Sprandel ([16], [68]).

All die genannten Vorzüge dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, daß den Erythrozytenschatten als biologischem Trägersystem noch immer eine sehr wichtige Eigenschaft fehlt: eine exakte Beeinflußbarkeit und Steuerbarkeit im Sinne von Widders "drug-targeting", das heißt die Möglichkeit, solche mit Medikamenten beladenen Trägererythrozyten von außen

zu ihrem Zielorgan lenken zu können. Appliziert man beispielsweise Trägererythrozyten intravenös, so verteilen sie sich fast völlig gleichmäßig auf das gesamte Gefäßsystem, ohne daß man eine gezielte Anreicherung in bestimmten Geweben erreichen könnte. Eben dies aber wäre im Rahmen einer Tumorthherapie zu fordern. Erst nach ihrem Abbau durch das "Retikulo - endotheliale System" (RES) finden sich 80 - 95 % der Trägererythrozyten bzw. ihre Fragmente und die von ihnen transportierten Pharmaka in Leber und Milz wieder. Jede zytostatische Therapie auf dieser Basis müßte sich zwangsläufig auf die relativ geringe Anzahl der Neoplasien des RES beschränken, was Lynch et al. 1980 bereits erfolgreich zur Anwendung brachten ([42]).

Um eine gezieltere Anwendung der Trägersysteme zu ermöglichen, schlugen Senyei und Widder 1978 die Verwendung ferromagnetischer Stoffe vor ([58],[73]). Schon 1963 hatten Meyers et al. ([44]) sowie einige andere Wissenschaftler in Vorversuchen gezeigt, daß sich Eisenpartikel durch die Anwendung äußerer Magnetfelder an den Wänden der Blutgefäße von Versuchstieren festhalten ließen. Zahlreichen Forschern gelang es inzwischen, Albumin-Mikrosphären, die mit Magnetit (Fe_3O_4) beladen waren, nach ihrer Infusion durch das Anlegen starker äußerer Magnetfelder in bestimmten Körperregionen von Versuchstieren anzureichern. Waren diese ferromagnetischen Mikrosphären zusätzlich noch mit Zytostatika bestückt, so konnte man nach ihrer Anreicherung in Tumoren z.B. bei Ratten einen deutlichen Rückgang der Geschwülste verzeichnen ([23], [25], [30], [31], [32], [33], [45], [46], [47], [50], [59], [70], [74], [76]).

Bei diesen doch recht ermutigenden Ergebnissen mit ferromagnetischen Albumin-Mikrosphären liegt der Gedanke nahe, ob nicht auch Trägererythrozyten durch den zusätzlichen Einschluß solcher ferromagnetischer Partikel in Zukunft mit Hilfe von Magnetfeldern besser gesteuert oder in ihrer Verteilung gar auf ein bestimmtes Zielorgan beschränkt werden können, zumal Untersuchungen gezeigt haben, daß Magnetfelder für den Organismus praktisch keine schädigende Wirkung haben ([17],[34]). Dieser Frage nachzugehen, war das Ziel der vorliegenden Versuche.

Die Arbeit gliedert sich in drei große Teile: Zunächst wurde versucht zu klären, ob, und wenn ja, unter welchen Bedingungen ein Einschluß von Magnetitpartikeln in die Erythrozyten überhaupt möglich ist. Da dies bisher noch von niemandem probiert worden ist, mußten hierbei auch zahlrei-

che Vorversuche durchgeführt werden, um grundlegende Erfahrungen im Umgang mit ferromagnetischen Materialien zu sammeln. In einem zweiten Schritt wurde getestet, wie lange ferromagnetische Trägererythrozyten nach Beendigung der Präparation ihre neu gewonnenen magnetischen Eigenschaften behalten, und ob etwa starke Leckströme von Magnetitpartikeln aus den beladenen Erythrozytenschatten heraus der Anwendung solcher Träger eine zeitliche Grenze setzen. Zuletzt wurden mit einem In-vitro-Kreislaufmodell die Verhältnisse des Blutgefäßsystems imitiert, um Aussagen über die Beeinflussbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten mittels starker äußerer Magnetfelder machen zu können.

Es ist klar, daß einige Fragen, die bei einer späteren Anwendung magnetisierbarer Trägererythrozyten relevant würden, im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet bleiben mußten, z.B. das Problem, auf welchen Wegen Magnetitpartikel verstoffwechselt und wieder aus dem Körper ausgeschieden werden können, ob sie gespeichert werden und damit den Eisenpool des Körpers belasten und zu einer Eisenspeicherkrankheit führen können. Diese und ähnliche Fragen letztgültig zu klären, konnte nicht Aufgabe dieser Arbeit sein, die als Pilotstudie konzipiert war, um grundlegende Voraussetzungen für spätere In-vivo-Versuche mit ferromagnetischen Trägererythrozyten zu schaffen.

2. EINSCHLUSS VON "FERROFLUIDS" IN ERYTHROZYTEN - GRUNDLAGEN DER METHODIK UND VERSUCHE ZUR STANDARDISIERUNG UND OPTIMIERUNG DES PRÄPARA- TIONSABLAUFES BEI DER HERSTELLUNG FERROMAG- NETISCHER TRÄGERERYTHROZYTEN.

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. Erythrozyten

Bei allen Versuchen wurde frisch gewonnenes Blut von gesunden Probanden verwendet, welches gleich bei der Entnahme mit Heparin versetzt wurde (1000 I.E. Heparin/10 ml Vollblut). Anschließend wurde das Vollblut 15 min. bei +4° C und 530 g zentrifugiert. Durch vorsichtiges Absaugen des Überstandes (Serum und Leukocyten) konnte eine reine Erythrozytensuspension gewonnen werden.

2.1.2. Pufferlösungen

Es kamen drei verschiedene Dialysepuffer zur Anwendung:

Puffer I: isoosmolarer Phosphatpuffer (150 mM NaCl; 5 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ;
pH = 7,4)

Puffer II: hypoosmolarer Phosphatpuffer (kein NaCl; 5 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ;
pH = 7,4)

Puffer I*: angereicherter isoosmolarer Phosphatpuffer, der eine schonendere Präparation und bei Lagerung längere Überlebenszeiten für Trägererythrozyten ermöglicht.

(wie Puffer I, zusätzlich 10 mM Glucose + 5 mM Adenosin +
+ 1 mM $MgCl_2$; pH = 7,4)

2.1.3. Chemikalien für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die REM standen folgende Chemikalien in der den allgemeinen laborchemischen Richtlinien entsprechenden Reinheit zur Verfügung:

Aqua bidest.

0,25 %ige Poly - L - Lysin - Lösung (P 1886 Sigma)

3 %ige Glutardialdehyd - Lösung (0,6 ml 25 %iger Glutardialdehyd + 4,4 ml
0,1 M Natriumcacodylat - Puffer mit 5 %
Saccharose)

0,1 M und 0,2 M Natriumcacodylat - Puffer

1 %ige Osmiumtetroxid - Lösung (OsO_4 in 0,2 M Natriumcacodylat - Puffer)

Äthanol in aufsteigenden Konzentrationen (50 % - 100 %)

Leitsilber zur Fixierung

2.1.4. Chemikalien zur Hämoglobinbestimmung

Für die Hämoglobinbestimmung wurde das Testsystem "Hämoglobin" (Bestell-Nr. 124 729 / Hämiglobincyanid - Methode) der Firma Boehringer Mannheim Diagnostica entsprechend den Richtlinien des Herstellers eingesetzt.

2.1.5. Ferrofluids

Ferrofluids sind dauerhafte, kolloidale Suspensionen von Magnetitpartikeln (Fe_3O_4), die von Ferrofluidics Corporation, Nashua New Hampshire 03061 / USA, respektive der deutschen Vertretung Ferrofluidics GmbH in D-7440 Nürtingen hergestellt und vertrieben werden. Ferrofluids werden in den verschiedensten chemischen Aufbereitungen geliefert. Für biologische Experimente eignen sich nur Magnetitsuspensionen auf Wasserbasis.

Bei allen Versuchen (abgesehen von orientierenden Vorversuchen, siehe auch Abschnitt 2.3.2.2.) verwendete ich ausschließlich Ferrofluids Typ BIO-I (Katalog - Nr. EMG 1111), die laut Angaben des Herstellers außer Magnetitpartikeln in Aqua dest. keine weiteren organischen oder anorganischen Lösungsmittel enthalten und höchstens eine geringe Toxizität aufweisen. Diese Ferrofluids erbrachten bei eigenen Vorversuchen im Vergleich mit anderen chemischen Zubereitungen eindeutig die besten Ergebnisse.

Die physikalischen Daten von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tab. 1: Physikalische Daten von "Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)" laut Herstellerangaben

Lösungsmittel	Aqua dest.
Magnetische Sättigung	200 Gauss
Dichte	1,18 g/ml
Viskosität (bezogen auf + 27° C)	5 - 10 cp
Siedepunkt (bei 760 mm Hg)	100 ° C
initiale Suszeptibilität	0,6
Oberflächenspannung	26 dyne/cm
Wärmeleitfähigkeit	$586 \text{ W/}^\circ\text{C} - \text{cm} \times 10^5$
Spezifische Wärme	$1,0 \text{ cal/}^\circ\text{C} - \text{g}$
Thermaler Ausdehnungskoeffizient	$5,2 \text{ cm}^3/\text{cm}^3 \text{ }^\circ\text{C} \times 10^4$
Magnetische Partikel	25 Gew% der Suspension
Durchschnittliche Partikelgröße	80 - 200 Å (durchschnittlich etwa 180 Å)

Alle Angaben beziehen sich auf eine Temperatur von + 25° C.

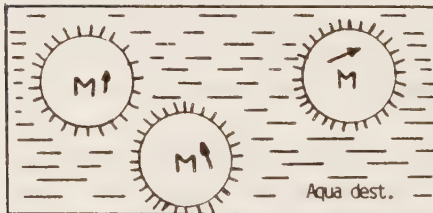


Abb. 1:

Schematischer Aufbau der Ferrofluids: Partikel, die aus einem Magnetitkern und einer wasserlöslichen Oberflächenhülle bestehen, als Suspension in Aqua dest.

2.1.6. Geräte

2.1.6.1. Präparation der Trägererythrozyten

Bei der Präparation der Trägererythrozyten (vgl. Abschnitt 2.2.1.) wurden folgende Laborgeräte verwendet:

- Eppendorf-Präzisionspipetten (5 µl bis 10 ml)
- Dialyseschläuche der Firma Reichelt Chemie
- Zentrifuge "Hettich Roto Silenta/ K" der Firma Bachofer Laborgeräte, Reutlingen (Bereich von 10 g = 200 U/min bis 3305 g = 4000 U/min)

- ein Rotator der Firma Cenco GmbH, Haan Kat.No. 34528 (Laufgeschwindigkeit 10 U/min)
- zur Ultraschallung der Ferrofluids ein "Ultra - Sonicator" (Frequenzbereich: 20 bis 100 kHz)

2.1.6.2. Suszeptibilitätsmessung

Zur Suszeptibilitätsmessung (vgl. Abschnitt 2.2.2.) kamen ein Sinus-generator als Spannungsquelle und ein Lock-in-Verstärker als phasenempfindliches Wechselspannungsvoltmeter zur Anwendung.

2.1.6.3. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Herstellung der REM-Präparate wurden folgende Geräte benötigt:

- Aluminium specimen stubs als Präparatträger
- Zur Goldbedampfung ein Gerät der Bauart "SEM Autocoating Unit 5200 - 150" - 20 mA - Sputtering" von Polaron Equipment Ltd.(Watford)
- Elektronenmikroskop: JEOL JSM - 35 CF Scanning Microscope (20 kV, Vergrößerung: 2000-fach bis 10000-fach)
- Die Aufnahmen wurden mit einer Mamiya 6x7 - Kamera gemacht.

2.1.6.4. Hämoglobinbestimmung

Als Photometer bei der Hämoglobinbestimmung wurde ein "Perkin - Elmer 550^S UV/Vis - Spectrophotometer" verwendet.

2.1.6.5. Zellzählung

Zur Bestimmung der Anzahl von Trägererythrozyten im gegebenen Volumen einer Zellsuspension wurde ein "Coulter-Counter MS 30" (Coulter Electronics Ltd., Northwell Drive. Luton.Beds. England) benutzt.

2.1.6.6. Magnet

Für die Versuche im Magnetfeld wurde ein Hufeisenmagnet verwendet:

- Magnetische Feldstärke: 1200 Gauss
- Magnetfeldgradient: 750 Gauss/cm

2.2. METHODEN

2.2.1. Das Verfahren der hypoosmolaren Dialyse zur Herstellung von Trägererythrozyten

Die von Dale et al. ([10]), DeLoach et al. ([11]) und Sprandel et al. ([16],[61],[67],[68]) angegebene Methode zur Präparation von Erythrozytenschatten konnte im großen und ganzen übernommen werden. Sie wurde nur entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche in einigen Details gering modifiziert und erweitert, um sie an die besonderen Gegebenheiten bei der Arbeit mit Ferrofluids anzupassen.

Auf die theoretischen wissenschaftlichen Grundlagen und Hypothesen zur Methode der reversiblen Eröffnung von Erythrozytenmembranen mit Hilfe der hypoosmolaren Dialyse möchte ich hier nicht näher eingehen, sondern verweise dazu auf die ausführlichen Arbeiten zur Morphologie und Biologie des Erythrozyten von Baker ([4]) und Gratzner ([19]), sowie grundlegende Arbeiten und Studien zur Methodik und dem Mikromechanismus der Präparation von Erythrozytenschatten von Baker ([5]), Dale ([10]), Fiddler ([18]), Kanda et al. ([29]), Seeman ([57]) und Lieber & Steck ([41]).

Nach der Standardisierung des Verfahrens in einigen Vorversuchen (vgl. hierzu die Abschnitte 2.2.4./2.2.5. sowie 2.3.2.) ging die Beladung von Erythrozyten folgendermaßen vor sich:

Die aus frisch abgenommenem heparinisierten Vollblut durch Zentrifugieren und anschließendes Abziehen von Plasma und Leukozyten gewonnenen Erythrozyten wurden zunächst zweimal für 15 Minuten bei + 4°C und 530 g in Puffer I gewaschen (d.h. nach Aufschütteln der Erythrozytensuspension in Puffer I zentrifugiert), um Serumrückstände und sonstige Verunreinigungen aus der Zellsuspension zu entfernen. Die Überstände nach dem Zentrifugieren wurden jeweils mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen und verworfen.

Nun wurden die gewaschenen Erythrozyten vorsichtig mit einer Meßspritze in die Dialyseschläuche gefüllt, welche vorher einige Minuten lang in Puffer I eingeweicht worden waren. Dann erfolgte die Zugabe

einer 1:4-Mischung aus den einzuschließenden Ferrofluids und Puffer I, bis im Dialyseschlauch ein Hämatokrit von 75 % erreicht war, d.h. 3 Volumenteile Erythrozytensuspension auf 1 Volumen-
teil Ferrofluid-Puffer-Gemisch kamen. Die Mischung von Magnetitteilchen und Puffer I war vorher aus 1 Volumenteil Ferrofluids und 3 Volumenteilen Puffer I hergestellt und durch die Zugabe von 0,29 g NaCl/100 ml Mischung wieder auf isoosmolare Werte (150 mM NaCl) gebracht worden.

Die fertig abgefüllten Dialyseschläuche wurden an beiden Enden verknotet und mit zwei Gummis straff an einem Glasstab befestigt, der etwa die Länge der Präparationsgefäße haben sollte. Dabei war zu beachten, daß beim Verschließen der Dialyseschläuche eine ausreichend große Luftblase eingeschlossen wurde, die später für eine gute Mischung von Erythrozyten und Ferrofluids während der Präparation sorgen sollte. Die Glasstäbe mit den Dialyseschläuchen wurden jetzt in je ein mit Puffer II gefülltes Präparationsgefäß eingebracht (Säckcheninhalt maximal 8 ml; Gefäßinhalt etwa 180 ml) und das Ganze für 75 Minuten bei + 4° C inkubiert, wobei ein Rotator für eine ständige Mischung des Gefäßinhaltes sorgte (Abb. 2 und Abb. 3). Entfällt dieses Mischen während des Dialysevorgangs, so sinkt die Einschlußrate um mehr als 90 % (vgl. [61]).



Abb. 2:

Das an einem Glasstab befestigte Dialysesäckchen im mit hypoosmolarem Puffer II gefüllten Präparationsgefäß. (nach [10])

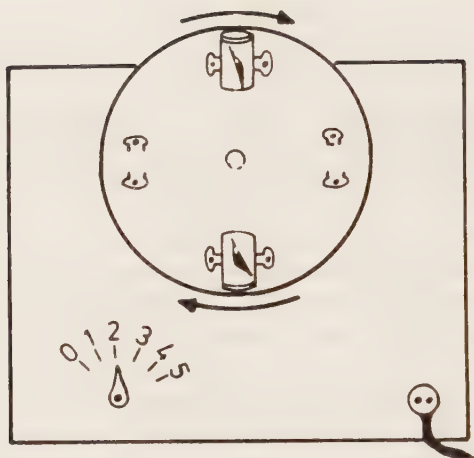


Abb. 3:

Rotator mit zwei Präparationsgefäßen. Der Rotator sorgt für ausreichende Mischung von Erythrozyten und Ferrofluids.

Nach der 75-minütigen Inkubation bei $+4^{\circ}\text{C}$ wurden die Glasstäbe mit den Dialyseschläuchen in ein zweites Präparationsgefäß mit angereicher-tem isoosmolaren Puffer I* überführt und dann, wieder unter ständiger Rotation, für 60 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ inkubiert. In dieser Zeit fand das "re-sealing", also der Wiederverschluß der vorher eröff-neten Erythrozytenmembranen, statt. Damit war die eigentliche Beladung der Erythrozyten mit Ferrofluids beendet, und die präparierten Zellen mußten nur noch gereinigt werden.

Zu diesem Zweck wurde der Inhalt je eines Dialyseschlauchs vorsichtig mit einer Spritze in ein Zentrifugenglas überführt und dasselbe mit Puf-fer I* aufgefüllt. Die Zentrifugenröhrchen wurden nun für 20 Minu-ten bei $+20^{\circ}\text{C}$ mit 530 g zentrifugiert. Danach zeigte sich folgende Schichtung (Abb. 4): Am Boden des Zentrifugenröhrchens fanden sich die Ferrofluid-Partikel, die während der Dialyseprozedur nicht in die Erythrozyten eingeschlossen worden waren. Darüber lag die Schicht der beladenen Trägererythrozyten. Ganz oben waren als Überstand Puffer, frei-es Hämoglobin, freie Magnetitpartikel und Erythrozytenfragmente zu fin-den.

Der nun folgende Waschgang ist mit allen Details in Abb. 5 (Seite 14)

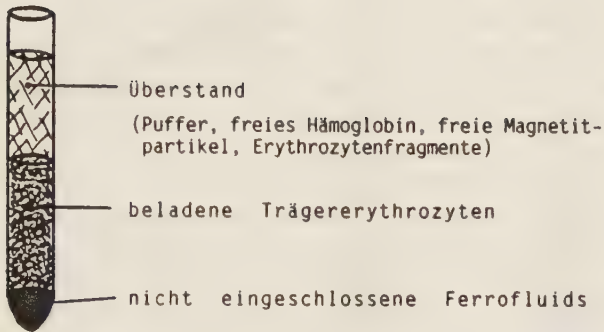


Abb. 4: Schichtung im Zentrifugenröhrchen nach dem ersten Zentrifugendurchlauf (20 Min., + 20° C, 530 g)

schematisch dargestellt. Zunächst wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und verworfen (Abb. 5 a). Dann wurde die Schicht der Trägererythrozyten behutsam mit einer Pipette abgehoben und in ein neues Reagenzglas umgefüllt, wobei die nicht eingeschlossenen Ferrofluid-Partikel durch einen am Boden des Zentrifugenröhrchens platzierten Magneten festgehalten wurden (Abb. 5 b). Es zeigte sich, daß spitz zulaufende Zentrifugenröhrchen den üblichen runden Reagenzgläsern überlegen waren, weil die Magnetitteilchen während des Zentrifugierens fest in die Spitze der Zentrifugenröhrchen gepreßt wurden und die Trägererythrozyten darüber leichter abgehoben werden konnten, ohne daß durch Aufwirbeln der Ferrofluids eine zu große Wiederverunreinigung der Zellsuspension entstanden wäre.

Um die Suspension der Trägererythrozyten noch von weiteren frei in der Lösung befindlichen Magnetitpartikeln zu reinigen, wurden die in das frische Reagenzglas überführten Zellen noch einmal mit Puffer I* aufgeschüttelt (Abb. 5 c) und für 10 Minuten einem starken äußeren Magnetfeld ausgesetzt (Abb. 5 d), ehe sie mit einer Pipette vorsichtig wiederum in ein frisches Zentrifugenröhrchen übertragen (Abb. 5 e) und erneut für 20 Minuten bei +20° C mit 530 g zentrifugiert wurden (Abb. 5 f).

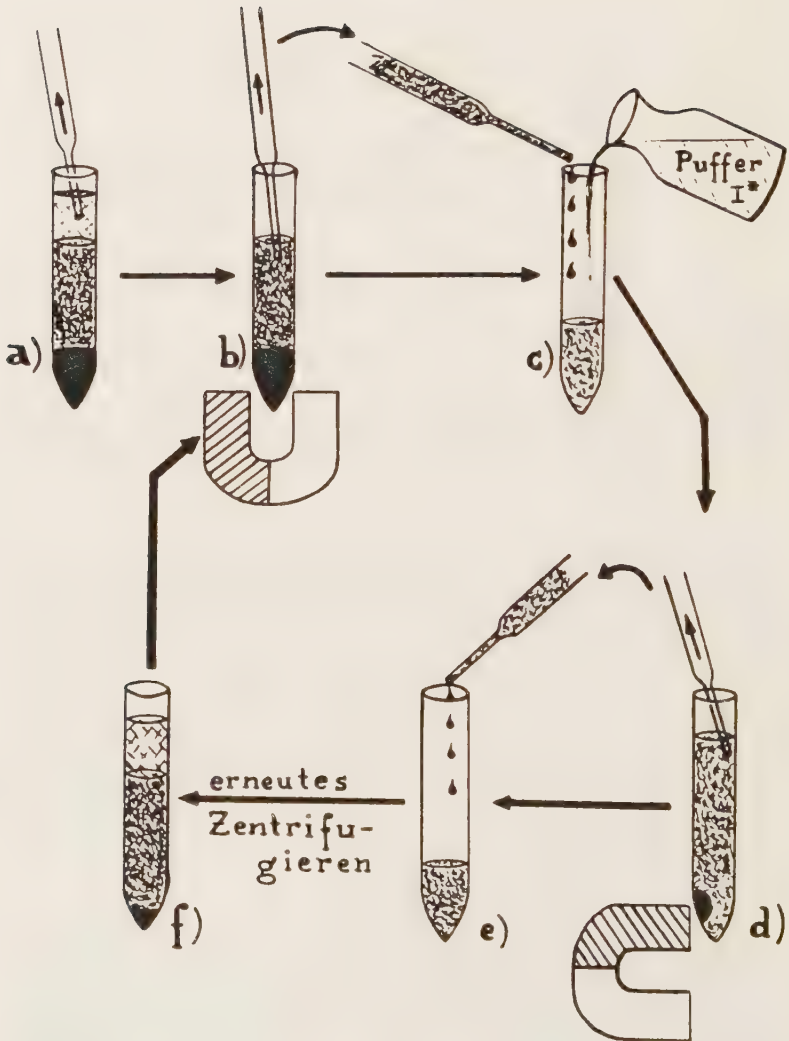


Abb. 5: "Waschgang mit magnetischer Reinigung" (genaue Angaben im Text)
Nach Abziehen des Überstandes und Aufschütteln der Trägererythrozyten in Puffer I* werden mit einem Magneten freie Magnetitpartikel weitgehend aus der Zellsuspension entfernt, ehe diese erneut zentrifugiert wird.

Dieser "Waschgang mit magnetischer Reinigung" wiederholte sich drei- bis viermal, solange bis der Überstand klar war (wenig freies Hämoglobin!) und sich mit dem Magneten keine sichtbaren Ferrofluid-Rückstände mehr abziehen ließen. Nach dem letzten Waschgang wurden die Trägererythrozyten dann in der jeweiligen Versuchsanordnung getestet (Suszeptibilitätsmessung, Kreislaufmodell usw.) oder bis zu ihrer Verwendung bei $+4^{\circ}\text{C}$ in Puffer I* gelagert.

Es zeigte sich, daß selbst mit dem oben beschriebenen minuziösen Verfahren geringe Restverunreinigungen der Trägererythrozytensuspension durch nicht eingeschlossene, frei in Lösung befindliche oder nur von außen an die Erythrozytenmembran angelagerte Magnetitpartikel zurückblieben, die bei der anschließenden Suszeptibilitätsmessung mit erfaßt wurden und ohne entsprechende Korrektur zu fälschlich hohen Meßwerten geführt hätten. Weitere zusätzliche Waschgänge aber hätten die Zellmembranen zu sehr strapaziert, ohne dabei die Restverunreinigung noch erheblich zu senken. Auch eine zunächst vorteilhaft erscheinende Dichtegradientenzentrifugation, welche die freien Ferrofluid-Partikel und die beladenen Trägererythrozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte eindeutig hätte separieren können, erwies sich als nicht durchführbar, weil sowohl die dazu notwendigen hohen Dichtegradienten (Konzentrationsgradienten) auf osmotischem Weg als auch die erforderlichen hohen Umdrehungszahlen (mehrtausendfache Erdschleunigung) auf mechanischem Weg die beladenen Zellen irreversibel zerstört hätten.

Um die unvermeidliche Verunreinigung dennoch in den Griff zu bekommen, mußte ein Kompromiß zwischen größtmöglicher Schonung der Zellen bei der Präparation (nicht mehr als vier Waschgänge nach Beladung der Zellen) und kleinstmöglicher Verunreinigung der fertigen Suspension von Trägererythrozyten eingegangen werden. Deswegen wurden bei jeder Präparationsreihe stets auch Kontrollansätze durchgeführt. Diese Kontrollzellen erfuhren die gleiche Behandlung wie die zu beladenden Erythrozyten, mit der einen Ausnahme, daß sie während der Aufschlußzeit nicht gegen den hypoosmolaren Puffer II, sondern gegen den isoosmolaren Puffer I dialysiert wurden, so daß ihre Zellmembranen nicht eröffnet werden konnten und infolgedessen kein Einschluß von Magnetitpartikeln in die Kontrollzellen erfolgte. Die nach den Waschgängen verbleibende Suszeptibilität dieser Kontrollzellen repräsentierte also "äußerliche magnetische

Valenzen", das heißt die Verunreinigungen der Zellsuspension durch freie Ferrofluids.

Die tatsächliche Beladungsrate der Trägererythrozyten unter Berücksichtigung der Verunreinigungen ergab sich dann einfach als Differenz der gemessenen Suszeptibilitäten von Trägererythrozyten und Kontrollansätzen:

$$\boxed{\text{tatsächliche Suszeptibilität der Trägererythrozyten}} = \boxed{\text{gemessene Suszeptibilität der Trägererythrozyten}} - \boxed{\text{gemessene Suszeptibilität der Kontrollzellen}}$$

2.2.2. Suszeptibilitätsmessungen als Methode zur Bestimmung der Beladungsrate von Trägererythrozyten mit ferromagnetischen Makromolekülen

2.2.2.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Um bei den Versuchen das Ausmaß der erfolgten Beladung der Trägererythrozyten mit Magnetitpartikeln bestimmen zu können, mußte eine geeignete Meßmethode gefunden werden, da die sonst bei ähnlichen Experimenten verwendete radioaktive Markierung oder Kopplung der zu messenden Substanzen an ein Enzym und anschließende Durchführung eines enzymatischen Tests (ELISA) bei der Arbeit mit Ferrofluids einige Schwierigkeiten aufwerfen.

So könnten die ohnehin chemisch komplizierten und labilen Ferrofluid-Partikel hinsichtlich ihrer Magnetisierbarkeit, ihres Verhaltens im Erythrozyten und ihres Einflusses auf die Enzym- und Membransysteme, und damit auf die Überlebenszeit des Trägererythrozyten nach der Beladung durch eine radioaktive Markierung oder durch eine Enzymkopplung verändert werden. Da man nicht ausschließen kann, daß auch die Kinetik und die physikalisch-chemischen Eigenschaften beim Einschluß von unmarkierten und von markierten Ferrofluids unterschiedlich sind, wären die Ergebnisse einer auf solchen Meßmethoden beruhenden Untersuchung nur bedingt aussagekräftig.

tig und nur mit Einschränkungen vom In-vitro-Test auf einen In-vivo-Test übertragbar, zumal bei einer eventuellen späteren diagnostisch-therapeutischen Verwendung ferromagnetischer Trägererythrozyten auch nur unmarkierte Zellen zum Einsatz kommen dürften.

Deswegen erschien es am günstigsten, die Beladungsrate von Trägererythrozyten mit ferromagnetischen Partikeln über eine Messung der neu erworbenen magnetischen Eigenschaften dieser Zellen zu bestimmen. Das setzt voraus, daß man sich zunächst Klarheit über die magnetischen Eigenschaften unbehandelter Erythrozyten verschafft. Außerdem muß man ausschließen können, daß sich die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids durch ihren Einschluß in Erythrozyten verändern, z.B. durch zellgebundene Enzymsysteme, Wechselwirkungen der Ferrofluids mit dem Eisen im Hämoglobin, intrazelluläre Redoxsysteme, Isolierung der Magnetitteilchen durch Membranproteine oder andere Mechanismen. Sonst würde man eventuell falsche Beladungsraten messen, wenn ein Teil des eingeschlossenen Materials "inaktiviert" und somit einer Meßmethode, die nur die Magnetisierbarkeit einer Blutprobe als Meßparameter benutzt, nicht mehr zugänglich ist.

Aufgrund eigener Vorversuche (vgl. hierzu die Abschnitte 2.2.4. sowie 2.3.1.) und der vorliegenden Arbeiten von Kondorsky et al. über den Einfluß von Magnetfeldern auf Erythrozyten und die Suszeptibilität von unbehandelten menschlichen Erythrozyten ([37],[38]), von Alpert & Banerjee über die magnetische Suszeptibilität von Hämoglobin ([2]) und von Leitmannová über die Veränderungen der Erythrozytenmembranen unter dem Einfluß von äußeren Magnetfeldern ([39]) konnten die oben genannten Einwände entkräftet werden. Somit erwies sich die Methode der Suszeptibilitätsmessung, die die Magnetisierbarkeit eines bestimmten Volumens einer Suspension von Trägererythrozyten bestimmt, als hervorragend geeignet, den Beladungsgrad von Trägererythrozyten mit hoher Genauigkeit messen zu können, ohne den Beladungsmechanismus in irgendeiner Weise zu beeinflussen und so das Meßergebnis zu verfälschen. Zudem bietet die von v. Hörsten weiterentwickelte Methode der Suszeptibilitätsmessung über die Bestimmung von Änderungen der Wechselstrom-Impedanz einer Spule (Einzelheiten siehe Abschnitt 2.2.2.3.) die Möglichkeit, auch sehr geringe magnetische Suszeptibilitäten bis in para- und diamagnetische Bereiche quantitativ zu erfassen. Dazu bedient sie sich sehr kleiner äußerer Magnetfeldstärken ($H \lesssim 10$ A/m), die in keiner Weise biologische oder medizini-

sche Proben schädigen (zum Vergleich: das Magnetfeld der Erde hat eine ungefähre Feldstärke von 40 A/m).

Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, hier alle physikalischen Grundlagen über Magnetismus, Elektromagnetismus, magnetische Induktion und Wechselstrom - Schwingkreise darzustellen. Darüber kann man sich in jedem Lehrbuch der Physik sicherlich besser und ausführlicher informieren (z.B. [36], vor allem Band II, Kap. 6.7.5. "Induktive Verfahren"). Ich beschränke mich im folgenden auf die zum Verständnis des Versuchsaufbaus notwendigen Voraussetzungen, wobei ich auf eine detaillierte mathematische Herleitung von Formeln verzichte. Die mathematischen Grundlagen sind ausführlich in der Arbeit von Söffge und v. Hörsten dargestellt ([60]). Einen recht guten Überblick auch über andere Methoden der Suszeptibilitätsmessung als der hier verwendeten findet man in der ausführlichen Arbeit von Jizuka und Yonetani ([28]).

2.2.2.2. Physikalische Grundlagen

Alle Materie ist aus Atomen mit einem positiven Kern und einer negativen Elektronenhülle aufgebaut. Die um den Kern kreisenden Elektronen, bewegte Ladungsträger, kann man als eine Art "elektrischen Strom" ansehen, der, in Abhängigkeit vom jeweiligen Aufbau der Elektronenhülle, in jedem Atom ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes resultierendes Dipolmoment erzeugt.

Bringt man Materie in ein äußeres Magnetfeld, so wird sie, je nach ihrer Zusammensetzung, in gewissem Maß selbst magnetisiert. Diese Magnetisierbarkeit läßt sich so erklären, daß durch ein äußeres Magnetfeld in der Materie entweder vorher noch nicht bestehende magnetische Dipolmomente induziert, oder schon vorhandene Dipolmomente im Feld orientiert werden. Die Magnetisierung eines Stoffes $\vec{M}$ läßt sich als Summe aller in ihm vorhandenen magnetischen Momente $\vec{m}$ definieren, wobei N für die Anzahl der magnetischen Dipolmomente steht:

$$\boxed{\vec{M} = \sum \vec{m} = N \cdot \vec{m}} \quad (1)$$

Bei flüssigen Proben, z.B. Suspensionen ferromagnetischer Partikel, ist

die Magnetisierung $\vec{M}$ der Probe gleich dem Produkt aus dem Volumen V der Gesamtheit der magnetischen Partikel und ihrem magnetischen Moment $\vec{m}$:

$$\vec{M} = V \cdot \vec{m} \quad (2)$$

Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Magnetisierung $\vec{M}$ und der Feldstärke $\vec{H}$ des äußeren Magnetfeldes, in das die zu magnetisierende Probe eingebracht wird: je stärker das äußere Magnetfeld ist, umso größer wird auch, bei gleicher Zusammensetzung der Proben, die Magnetisierung sein. Die Proportionalitätskonstante, welche die Magnetisierung $\vec{M}$ und die Feldstärke $\vec{H}$ verknüpft, bezeichnet man als magnetische Suszeptibilität χ . Sie ist eine dimensionslose Zahl.

$$\vec{M} = \chi \cdot \vec{H} \quad \text{bzw.} \quad \chi = \frac{\vec{M}}{\vec{H}} \quad (3)$$

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Magnetisierbarkeit unterscheidet man drei Stoffklassen:

a) diamagnetische Stoffe:

Hier liegen die Elektronen der äußersten Elektronenschale jeweils paarweise zusammen, so daß sich ihre magnetischen Dipolmomente gerade aufheben. In einem äußeren Magnetfeld entstehen jedoch induzierte magnetische Dipolmomente, welche entsprechend dem Induktionsgesetz und der Lenz'schen Regel dem äußeren Magnetfeld entgegengesetzt sind. Die Suszeptibilität χ diamagnetischer Stoffe ist negativ und sehr klein.

b) paramagnetische Stoffe:

Hier sind bereits im Ruhezustand permanente magnetische Dipolmomente vorhanden; denn paramagnetische Stoffe besitzen keine abgeschlossenen äußeren Elektronenschalen, so daß die magnetische Wirkung (Spin- oder Bahnmoment) von mindestens einem unpaaren Elektron erhalten ist. Diese Dipolmomente der Atome sind jedoch zufällig verteilt und kompensieren sich gegenseitig. In einem äußeren Magnetfeld erfolgt eine Orientierung der Dipolmomente in Feldrichtung. Die Suszeptibilität χ ist hier positiv. Sie nimmt mit steigender Temperatur ab, weil die

Wärmebewegung der Atome einer Orientierung im magnetischen Feld entgegenwirkt.

c) ferromagnetische Stoffe:

Im Kristallgitter ferromagnetischer Substanzen existieren schon von vornherein mikroskopische Bereiche, in denen alle Elektronenspins parallel ausgerichtet sind, sogenannte "Weiß'sche Bezirke" oder "Elementarmagnete". Diese Bezirke besitzen jedoch wieder jeweils unterschiedliche Orientierungen, so daß der Stoff nach außen hin zunächst unmagnetisch erscheint. Im äußeren Magnetfeld wachsen die Bezirke, deren magnetische Spinnmomente etwa parallel zur Richtung der Feldlinien stehen; der Stoff wird magnetisiert.

Bei ferromagnetischen Stoffen ist die Suszeptibilität χ positiv und wesentlich größer als bei dia- und paramagnetischen Substanzen. Auch hier ist χ temperaturabhängig: oberhalb einer für jeden Stoff spezifischen Temperatur ("Curie-Temperatur") verhalten sich ferromagnetische Stoffe wie paramagnetische.

Die bei den vorliegenden Versuchen verwendeten Ferrofluids enthalten Magnetit (Fe_3O_4), welches zu den stärksten bekannten Ferromagnetika gehört.

Bei der Suszeptibilitätsmessung werden elektromagnetische Felder, die von stromdurchflossenen Spulen erzeugt werden, verwendet. Solche Felder können durch die physikalischen Größen der magnetischen Feldstärke $\vec{H}$ und der magnetischen Flußdichte $\vec{B}$ näher beschrieben werden.

Für die magnetische Feldstärke $\vec{H}$ gilt:

$$\vec{H} = \frac{I \cdot n}{l} \quad (4)$$

mit I : Erregerstrom, der die Spule durchfließt und das Magnetfeld erzeugt

n : Anzahl der Windungen der Spule

l : Länge der Spule

Die Einheit der magnetischen Feldstärke ist A/m.

Die magnetische Flußdichte $\vec{B}_0$ einer leeren Spule ist definiert

als:

$$\vec{B}_0 = \mu_0 \cdot \vec{H} = \mu_0 \cdot \frac{I \cdot n}{l} \quad (5)$$

mit μ_0 : magnetische Feldkonstante;

$$\text{Zahlenwert: } \mu_0 = 1,256637 \cdot 10^{-6} \frac{\text{V} \cdot \text{s}}{\text{A} \cdot \text{m}}$$

Die Einheit der magnetischen Flußdichte ist 1 Tesla (T) $= \frac{\text{V} \cdot \text{s}}{\text{m}^2}$, bzw. die alte Einheit 1 Gauss (1 Tesla = 10^4 Gauss).

Wird in das Innere einer Spule ein Materiekern eingebracht, so vergrößert sich die magnetische Flußdichte. Für die magnetische Flußdichte B von Spule und Kern gilt:

$$\vec{B} = \mu \cdot \mu_0 \cdot \vec{H} \quad (6)$$

mit μ : relative Permeabilität eines Stoffes, die angibt, um wieviel sich $\vec{B}$ vergrößert, wenn der vorher leere Raum innerhalb der Spule mit Materie gefüllt wird (im Vakuum: $\mu = 1$).

Zwischen der Permeabilität μ und der Suszeptibilität χ besteht die Beziehung

$$\mu = \chi + 1 \quad (7)$$

so daß man Gleichung (6) auch als

$$\vec{B} = (\chi + 1) \cdot \mu_0 \cdot \vec{H} \quad (8)$$

schreiben kann. Multipliziert man diese Gleichung aus, erhält man

$$\vec{B} = \underbrace{\mu_0 \cdot \chi \cdot \vec{H}}_{\text{steht für den Materiekern}} + \underbrace{\mu_0 \cdot \vec{H}}_{\text{steht für die leere Spule}} \quad (9)$$

Vergleicht man die Gleichungen (5) und (6) mit Gleichung (9), so wird ersichtlich, daß die Änderung der magnetischen Flußdichte bei Einbringen eines Materiekerns in die Spule nur von der Suszeptibilität und damit nach

(3) vom Grad der Magnetisierbarkeit der jeweiligen Materie abhängt.

Ebenso wie die magnetische Flußdichte ändert sich auch die Induktivität L einer Spule, wenn in die Spule ein Materiekern eingebracht wird:

$$L = L_0 \cdot \mu = L_0 \cdot (\chi + 1) \quad (10)$$

mit L : Induktivität von Spule und Kern

L_0 : Induktivität der leeren Spule

Schließlich sei hier noch erwähnt, daß der elektrische Gesamtwiderstand einer Spule im Wechselstromkreis als Impedanz Z bezeichnet wird. Die Impedanz Z setzt sich aus dem Ohm'schen Widerstand R_ω (frequenzunabhängig) und dem induktiven Widerstand R_L zusammen. R_L ist von der Frequenz des Wechselstroms abhängig:

$$R_L = \omega \cdot L \quad (11)$$

mit ω : Frequenz des Wechselstroms

L : Induktivität der Spule

Auf diesen physikalischen Grundlagen basiert die im folgenden dargestellte Meßmethode, mit der im Prinzip eine Induktivitäts- bzw. Impedanzänderung einer Spule beim Einbringen der zu messenden Probe von mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten (=Materiekern) erfaßt wird.

2.2.2.3. Versuchsanordnung zur Suszeptibilitätsmessung

Der Schaltkreis der Versuchsanordnung ist in Abb. 6 wiedergegeben. Sie besteht aus zwei einlagigen zylindrischen Spulen A und B ($n = 50$ Windungen; Durchmesser 8 mm; Länge 20 cm), die gegensinnig geschaltet sind. Ein Sinusgenerator speist über einen im Vergleich zur Spulenimpedanz großen Vorwiderstand ($R_V = 10 \text{ k}\Omega$) einen Wechselstrom I (Frequenz 50 kHz) ein. Wegen des großen Vorwiderstandes können die Änderungen des Stromes aufgrund der Impedanzänderungen von Spule und Kern (Probe) vernachlässigt werden, so daß die Stromstärke I als nahezu konstant angesehen werden

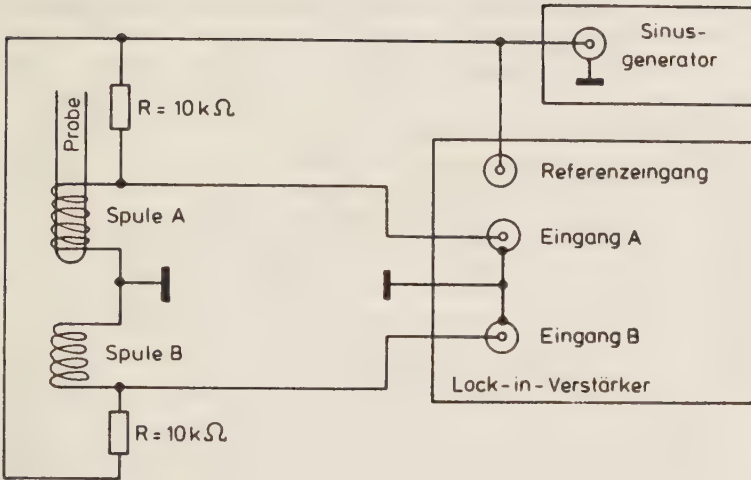


Abb. 6: Elektrischer Schaltkreis der Meßanordnung (genaue Beschreibung im Text).

kann. Wegen der Temperaturabhängigkeit von χ wurden alle Messungen bei konstanter Temperatur ($+ 20^\circ\text{ C}$) durchgeführt.

Die zu messende Probe, jeweils genau 0,5 ml einer definierten Suspension von mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten, wurde in ein kleines Reagenzglas abgefüllt und dann in das Innere der Spule A (Abb. 6) eingebracht. Dadurch änderte sich, wie oben erläutert, die Induktivität und somit auch die Impedanz der Spule A, was sich in einer Veränderung der an Spule A abfallenden Wechselspannung $\hat{U}$ niederschlägt. Die an der Spule induzierte Spannung wurde mit einem Lock-in-Verstärker gemessen, der als phasempfindliches Wechselstromvoltmeter diente (Abb. 6).

$\hat{U}$, der induktive Anteil der an Spule und Kern (Probe) abfallenden Spannung, kann nach dem Ohm'schen Gesetz und unter Verwendung von Gleichung (11) geschrieben werden als:

$$\hat{U} = R_L \cdot I = I \cdot \omega \cdot L \quad (12)$$

mit I : Wechselstrom; wegen des großen Vorwiderstandes nahezu konstant

ω : Frequenz des Wechselstroms (50 kHz)

L : Induktivität der Spule

Unter Verwendung der Gleichungen (10), (3) und (4) erhält man

$$\hat{U} = I \cdot \omega \cdot L_0 \cdot \left(\frac{\vec{M} \cdot \vec{l}}{I \cdot n} + 1 \right) \quad (13)$$

Da die Größen I, ω, L_0, l und n in der Meßanordnung als konstant angesehen werden können, kann man nunmehr vereinfacht schreiben:

$$\hat{U} \propto \vec{M} + \text{const.} \quad (14)$$

Diese Gleichung verknüpft also den Meßwert $\hat{U}$ mit der Magnetisierung $\vec{M}$ der Probe und damit, laut Gleichung (2), auch mit dem Volumen der Gesamtheit der in einer Probe enthaltenen Magnetitpartikel und deren magnetischem Moment $\vec{m}$.

Der konstante Term in Gleichung (14) entspricht dem Signal der leeren Spule. Durch die gegensinnige Schaltung zweier identischer Spulen A und B (vgl. Abb. 6) wird der konstante Term meßtechnisch ausgeglichen, so daß zum Schluß die sehr einfache Beziehung verbleibt

$$\hat{U} \propto V_{\text{Magnetit}} \quad \text{oder} \quad \hat{U} \propto \vec{m}_{\text{Magnetit}} \quad (15)$$

Dieses Prinzip der gegensinnigen Verschaltung von Meßspule A und Referenzspule B bewirkt zusätzlich eine erhebliche Steigerung der Meßgenauigkeit, weil so die gesamte Meßskala des Lock-in-Verstärkers allein für die zu messende Veränderung der Spannung $\hat{U}$ zur Verfügung steht, während die Spannungsveränderung bei Verwendung nur einer Spule lediglich zu einem kleinen zusätzlichen Zeigerausschlag zum Grundsignal der leeren Spule führen würde.

Wie Gleichung (15) zeigt, ist die Meßgröße $\hat{U}$ des Lock-in-Verstärkers direkt proportional zur Anzahl der ferromagnetischen Partikel, welche in

den Trägererythrozyten einer Meßprobe eingeschlossen wurden. Dadurch erübrigte es sich, die gemessenen Spannungsdifferenzen erst über einen komplizierten Formalismus und aufwendige Absoluteichmessungen in die tatsächlichen Zahlenwerte der Suszeptibilitäten umzurechnen. Deswegen wurden bei allen durchgeführten Suszeptibilitätsmessungen nicht die Absolutwerte von χ , sondern nur die Relativwerte der gemessenen Spannungsdifferenzen $\hat{U}$ angegeben.

Beispiel: Die Angabe, der Meßwert einer Probe sei $\chi_{5\mu V} = 3,5$ bedeutet, daß die Probe in einem Meßbereich des Lock-in-Verstärkers von $5\mu V/\text{Skalenteil}$ einen Ausschlag von 3,5 Skalenteilen, das heißt eine Spannungsänderung von $17,5\mu V$, hervorgerufen hat, wobei sich alle angegebenen Meßwerte immer auf ein Probenvolumen von 0,5 ml beziehen.

Zur Bestimmung der Einschluß- bzw. Beladungsrate wurde zunächst immer die gesamte im Präparationsansatz zum Einschluß angebotene Menge an Ferrofluids bestimmt, d.h. die Suszeptibilität aller vor der Dialyse im Dialyseschlauch befindlichen Ferrofluid-Partikel ermittelt und gleich 100 % gesetzt. Danach wurde die Suszeptibilität der beladenen Trägererythrozyten gemessen und als Prozentanteil der beim Versuch eingesetzten Ferrofluidmenge ausgedrückt.

Beispiel: Zur Beladung wurden in einen Dialyseschlauch 500 μl einer Ferrofluid-Puffer I-Mischung mit einer Suszeptibilität $\chi_{5\mu V} = 400$ und 1,5 ml einer Erythrozytensuspension eingefüllt. Das Gesamtvolumen des Präparationsansatzes betrug demnach 2,0 ml, auf jeweils 0,5 ml des Präparationsansatzes entfiel eine Suszeptibilität von $\chi_{5\mu V} = 100$.

Nach der Präparation wies eine Probe von Trägererythrozyten (0,5 ml) eine Suszeptibilität von $\chi_{5\mu V} = 7,5$ auf, das heißt die Beladungsrate betrug in diesem Fall 7,5 %, weil 7,5 % der pro Volumeneinheit angebotenen Ferrofluid-Partikel tatsächlich in die Erythrozyten eingeschlossen worden waren.

Abschließend sei erwähnt, daß die in diesem Kapitel theoretisch hergeleitete direkte Proportionalität zwischen Suszeptibilität und Menge der Magnetitpartikel/Vol.anhand von eigenen Vorversuchen empirisch bestätigt werden konnte (vgl. Abschnitt 2.3.1.3.). Außerdem konnte eine mögliche Beeinflussung der Meßergebnisse durch einen eventuell vorhandenen Eigenmagnetismus (wenn auch nur in paramagnetischen Bereichen) der Reagenzgläser oder der Lösungsmittel (Aqua dest. bzw. Pufferlösungen) ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 2.3.2.2.).

2.2.3. Herstellung von Präparaten für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Untersuchung der Morphologie von Trägererythrozyten

Da sich bei der Beladung von Erythrozyten mit Ferrofluids zeigte, daß das Ausmaß der Hämolyse während der Präparation größer war, als beim Einschluß anderer Substanzen, mußte angenommen werden, daß die Ferrofluids in irgendeiner Weise zytotoxisch wirkten. Um ihren Einfluß auf die Zellmembran der Erythrozyten und damit auf deren Morphologie nach der Beladung näher studieren zu können, wurden von beladenen Trägererythrozyten rasterelektronenmikroskopische Präparate hergestellt und ausgewertet.

Bei der Herstellung von REM-Präparaten kam die von Sprandel ([66]) beschriebene Methode zur Anwendung:

Dünne Deckgläschen (Durchmesser 12 mm), die als Objektträger dienten, wurden mit Chromschwefelsäure entfettet, sorgfältig mit Aqua dest. abgespült und anschließend mit einem dünnen Film einer 0,25 %igen Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet und getrocknet. Auf die so vorbereiteten Objektträger wurden die beladenen Trägererythrozyten aufgebracht und für eine Stunde bei +4° C in einer 3 %igen Glutardialdehydlösung fixiert. Danach wurde die Flüssigkeit von den Präparaten vorsichtig abgesaugt, die Präparate dreimal in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer gewaschen und anschließend über Nacht bei +4° C in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Präparate nach vorsichtigem Absaugen des Inkubationsmediums mit 1 %iger Osmiumtetroxid-Lösung (OsO_4 in 0,2 M Natriumcacodylatpuffer) überschichtet und für eine Stunde auf Eis gelagert. Nach Entfernen der Osmiumtetroxid-Lösung erfolgte ein dreimaliges Auswaschen der Präparate mit eiskaltem Aqua dest. und anschließend eine Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Äthanol: 50 % - 70 % - 80 % - 90 % - 95 % - dreimal 100 %), wobei die Dauer der Inkubation 5 - 10 Minuten in jeder Konzentrationsstufe betrug.

Die auf diese Weise fixierten Präparate mußten vor der Betrachtung im REM nur noch mit Leitsilber auf einen Präparateträger aufgebracht und danach mittels Vakuum - Goldbedampfung stabilisiert werden. Anschließend

konnten sie elektronenmikroskopisch untersucht und die Ergebnisse photographisch dokumentiert werden. Für die Zeit zwischen den einzelnen REM-Untersuchungen wurden die Präparate im Vakuum aufbewahrt.

2.2.4. Orientierende Vorversuche über die Eigenschaften der Ferrofluids

2.2.4.1. Löslichkeitsverhalten von Ferrofluids in verschiedenen Medien

Es wurde die Löslichkeit verschiedener Ferrofluids (EMG 805, EMG 807, EMG 1111 = BIO-I) in Leitungswasser, Aqua dest. und Puffer I, I* und II untersucht.

2.2.4.2. Verhalten von unverdünnten und von in Puffer I verdünnten Ferrofluids im Magnetfeld

Die Ferrofluids wurden zur Untersuchung ihrer magnetischen Eigenschaften auf eine Petrischale aufgebracht, unter welcher sich ein starker Hufeisenmagnet befand. In einem zweiten Versuch wurde das Verhalten der in einem Reagenzglas befindlichen Ferrofluids nach Annäherung eines starken Hufeisenmagneten an die Wand des Reagenzglases getestet.

2.2.4.3. Suszeptibilitätsmessungen von reinen Ferrofluids und Aufstellung einer standardisierten Eichkurve zur Ermittlung unbekannter Ferrofluidverdünnungen

Von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) wurde eine aufsteigende Verdünnungsreihe mit Puffer I hergestellt: unverdünnte Ferrofluids - 1:5-Verdünnung - 1:10-Verdünnung - 1:20-Verdünnung - 1:40-Verdünnung - 1:80-Verdünnung - 1:160-Verdünnung - 1:320-Verdünnung - 1:640-Verdünnung.

Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils Proben zu 0,5 ml abgefüllt und die Suszeptibilitäten dieser Proben bestimmt. Anhand der Ergebnisse konnte eine Eichkurve aufgestellt werden, welche Suszeptibilitätsmeßwerte

mit verschiedenen Konzentrationen von Ferrofluids verknüpft (vgl. Abschnitt 2.3.1.3.). Mit dieser Eichkurve war es später möglich, unbekannte Konzentrationen von Ferrofluid-Verdünnungen zu bestimmen und bei verschiedenen Lieferungen von Ferrofluids eventuelle Unterschiede in der Zusammensetzung oder der Magnetisierung festzustellen. Außerdem wurde die Eichkurve auch zur Qualitätskontrolle der Methode und zur Kontrolle der Arbeitsgenauigkeit herangezogen.

2.2.4.4. Untersuchung der Ferrofluids vor und nach Ultrabeschallung

Da Ferrofluids EMG 1111 (B10-I) eine Suspension von Magnetitpartikeln in Aqua dest. ohne jegliche Kolloidhüllen oder Detergentien darstellen, bilden sich rasch größere Konglomerate von Magnetitpartikeln, die vom Durchmesser und vom Molekulargewicht weit über den für einen Einschluß in Erythrozytenschatten anzusetzenden Grenzwerten*) liegen. Es ergab sich also die Notwendigkeit, vor der Beladung von Erythrozyten die entstandenen Ferrofluidkonglomerate wieder aufzulösen.

Dazu wurden die Ferrofluids zunächst unterschiedlich lange Zeiten einer mittleren Frequenz von Ultraschall (50 kHz) ausgesetzt und jeweils vor und nach der Beschallung im Rasterelektronenmikroskop untersucht; so konnte diejenige Beschallungszeit ermittelt werden, mit welcher die besten Ergebnisse bezüglich optimaler Partikelgröße und gleichmäßiger Verteilung der Magnetitpartikel in der Ferrofluid-Puffer-Mischung erzielt wurden. Ähnliche Untersuchungen wurden auch hinsichtlich verschiedener Ultraschallfrequenzen durchgeführt.

Zur Ultrabeschallung wurden die Ferrofluids in der jeweils nachher benötigten Verdünnung in ein Reagenzglas abgefüllt und zur Konstanterhaltung der Temperatur während der Beschallungsphase in eine eisgekühlte Halterung eingebracht. Anschließend wurde der Schallkopf des Ultra-Sonicators etwa zur Hälfte in das Reagenzglas eingetaucht und die Probe bei der entsprechenden Frequenz für die vorgesehene Zeit beschallt.

Um einen eventuellen Einfluß der Ultrabeschallung auf die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids auszuschließen, wurden auch die Suszeptibilitäten der Proben vor und nach der Beschallung gemessen und verglichen.

*) Molekulargewicht maximal 80 000 - 100 000 Dalton; Partikelgröße darf die Größe der entstehenden Membranporen (200 - 500 Å) nicht überschreiten. Vgl. dazu [10], [4] (S. 1796 - 1801), [75].

2.2.4.5. Chemische Analyse der Ferrofluids

Um chemische Verunreinigungen auszuschließen, wurden die Ferrofluids einer Verbrennungsanalyse im Sauerstoffstrom unterzogen. Freundlicherweise erklärte sich das Mikroanalytische Labor des Instituts für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München bereit, diese Analyse zu übernehmen.

2.2.5. Versuchsreihen zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Beladungsrate von Trägererythrozyten

2.2.5.1. Magnetische Eigenschaften unbehandelter Erythrozyten

Gewaschene, aber sonst unbehandelte Erythrozyten wurden einem starken äußeren Magnetfeld ausgesetzt und ihr Verhalten beobachtet. Außerdem wurde die Suszeptibilität gewaschener, unbehandelter Erythrozyten bestimmt.

2.2.5.2. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Art der eingesetzten Ferrofluids

Erythrozytenschatten wurden versuchsweise mit verschiedenen Ferrofluids beladen und anschließend jeweils der Grad der Hämolyse (Messung des Hämoglobingehaltes im ersten Waschüberstand), die Beladungsrate (Suszeptibilität der gewonnenen Trägererythrozyten) und die Morphologie der Trägererythrozyten (Rasterelektronenmikroskop) untersucht.

2.2.5.3. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Dauer der Ultraschallung der Ferrofluids sowie der Frequenz des eingesetzten Ultraschalls

Ferrofluids der gleichen Lieferung wurden unterschiedlich lange mit der gleichen Frequenz (50 kHz) ultraschallt oder bei verschiedenen Frequenzen einer Beschallung von stets 60 Sekunden unterzogen. Jede dieser unterschiedlich beschallten Ferrofluid-Proben wurde in Erythrozytenschatten

eingeschlossen und anschließend die Beladungsrate (Suszeptibilität) dieser Trägererythrozyten bestimmt.

2.2.5.4. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Konzentration der im Außenmedium angebotenen Ferrofluids

Beladungsrate und Morphologie der Trägererythrozyten wurden untersucht, wenn verschieden große Konzentrationen von Ferrofluids während der Dialyse im Außenmedium angeboten worden waren.

2.2.5.5. Abhängigkeit der Beladungsrate vom Hämatokrit des Präparationsansatzes

Die Präparation der Trägererythrozyten wurde bei verschiedenen Hämatokrits im Dialyseschlauch durchgeführt und anschließend die jeweils erzielte Beladungsrate bestimmt.

2.2.5.6. Abhängigkeit der Beladungsrate von weiteren Parametern

Bezüglich der Abhängigkeit der Beladungsrate von der Dauer der Dialysezeit, der Temperatur und dem pH-Wert während der Dialyse konnte auf die umfangreichen früheren Untersuchungen von Sprandel et al. ([61], [63], [64], [66], [68]) zurückgegriffen werden. Die dort diesbezüglich erarbeiteten optimalen Präparationsbedingungen wurden unverändert übernommen:

- Aufschluß der Zellen durch Dialyse gegen Puffer II
(Dialysezeit: 75 Minuten; Temperatur: + 4° C; pH = 7,4)
- Wiederverschluß der eröffneten Zellen durch Dialyse gegen Puffer I*
(Dialysezeit: 60 Minuten; Temperatur: + 37° C; pH = 7,4)

2.2.6. Statistische Betrachtungen

2.2.6.1. Fehlerberücksichtigung bei der Auswertung von Meßergebnissen

Unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit für zufällige Fehler wurde bei der Erhebung von Meßdaten (z.B. Suszeptibilitätsmessung, Extinktionsmessung bei der Hämoglobinbestimmung, Bestimmung der Zellzahl mit dem Coulter-Counter usw.) prinzipiell folgendermaßen verfahren:

Aus jeweils 5 Meßwerten der gleichen Probe wurde der arithmetische Mittelwert $\bar{x} = \frac{\sum x_n}{n}$ gebildet und die Standardabweichung $G = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$ ermittelt.

Alle in Tabellen oder im Text angegebenen Meßdaten stellen also stets den Mittelwert aus fünf Messungen dar, wobei für jede Meßreihe gesondert die Meßgenauigkeit $\pm G$ angegeben ist. Innerhalb dieses Bereiches der Meßgenauigkeit liegen dann rein statistisch 68,3 % der erhobenen Meßdaten.

Zusätzlich wurden die meisten Versuchsreihen in gleicher Versuchsanordnung mehrfach durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Ergaben sich bei wiederholter Durchführung gleicher Versuchsreihen erhebliche Differenzen zwischen den Ergebnissen, so wurde in der vorliegenden Arbeit an entsprechender Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen und die Interpretation dieser Ergebnisse ausführlich diskutiert.

2.2.6.2. Statistische Überlegungen bei der Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Morphologiestudien

Aus statistischen Erwägungen wurden bei der Auswertung der REM-Präparate stets jeweils 50 verschiedene, rein zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt, so daß bei einem Mittelwert von circa 50 Zellen/Gesichtsfeld von jedem Präparat etwa 2500 Zellen erfaßt wurden und bei der Interpretation der Ergebnisse Berücksichtigung fanden. Weitere Einzelheiten sind im Kapitel 2.2.3. bei der Beschreibung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Trägererythrozyten zu finden.

2.2.6.3. Anwendung des "Student-Tests" auf die Ergebnisse des In-vitro-Kreislaufmodells (Kapitel 4) zur Untersuchung der magnetischen Beeinflußbarkeit von Trägererythrozyten

Wie im Kapitel 4.2. noch ausführlich erläutert wird, wurde ein Kreislaufmodell zur Untersuchung der magnetischen Beeinflußbarkeit von Trägererythrozyten entwickelt. Dabei wurden bestimmte Teile eines Schlauchsystems einmal ohne und einmal mit am Schlauch angelegtem äußeren Magnetfeld von ferromagnetischen Teilchen oder Trägererythrozyten durchflutet. Anschließend wurde der Inhalt dieser Schläuche abgesaugt und darin die Suszeptibilität und der Hämoglobingehalt bestimmt. Wenn ferromagnetische Trägererythrozyten sich durch ein äußeres Magnetfeld hatten anreichern lassen, mußten die Suszeptibilität und der Hämoglobingehalt der Schläuche, an denen das Magnetfeld anlag, signifikant höher sein, als dieselben Parameter in den übrigen Schläuchen.

Zur Ermittlung eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen den verschiedenen Meßergebnissen wurde der Student-Test für verbundene Stichproben angewandt. Die Durchführung des Student-Tests erfolgte vollautomatisch mit einem Gerät des Typs "Hewlett-Packard 9820 A Calculator" der Firma Hewlett-Packard Cal. Products Division, Loveland, Colorado 80537. Auf die Wiedergabe der einzelnen mathematischen Rechenschritte sei deshalb an dieser Stelle verzichtet.

2.3. ERGEBNISSE

2.3.1. Eigenschaften der Ferrofluids

2.3.1.1. Löslichkeitsverhalten von Ferrofluids in verschiedenen Medien

Alle untersuchten Ferrofluids, die als Detergentien organische Lösungsmittel wie beispielsweise Ölsäure enthielten, lösten sich vollständig in Aqua dest. und allen verwendeten Phosphatpuffern. Es traten auch nach längerer Zeit keine größeren Konglomerate von Magnetitpartikeln auf. Ein Tyndall-Effekt wurde nicht beobachtet. Auch unter dem Einfluß starker äußerer Magnetfelder ließ sich die Lösung von solchen Ferrofluids (z.B. EMG 805, EMG 807 u.a.) in Aqua dest. oder Phosphatpuffern nicht entmischen.

Lediglich beim Versuch, diese Ferrofluids in Leitungswasser zu lösen, entwickelten sich große schwarze Klumpen, die sich weder durch Erhitzen noch durch Ultraschall wieder auflösen ließen. Vermutlich handelte es sich um Ausfällungen, die durch Wechselwirkungen von den im Leitungswasser enthaltenen Ionen (Ca^{++} u.a.) mit den Ferrofluids entstanden. Da diese Ferrofluids sich im weiteren Verlauf für die Beladung von Erythrozytenschatten als ungeeignet erwiesen und auch nicht weiter zum Einsatz kamen, wurde auf eine definitive Klärung dieses Phänomens verzichtet.

Im Gegensatz zu den oben genannten Ferrofluids waren Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I), welche, wie bereits erwähnt, laut Herstellerangaben nur in Aqua dest. aufgeschwemmte Magnetitpartikel ohne Zusatz irgendeines Lösungsvermittlers enthalten, in Aqua dest. und in Phosphatpuffern nicht vollständig homogen löslich. Im Gegenlicht betrachtet konnte man einen Tyndall-Effekt feststellen. Außerdem bildeten sich nach einiger Zeit größere Konglomerate, die beim Stehenlassen der Probe absedimentierten. Setzte man eine Suspension solcher Ferrofluids in Aqua dest. oder einem Phosphatpuffer einem starken äußeren Magnetfeld aus, so ließen sich in 25 - 30 Sekunden die Magnetitteilchen und die Lösungsflüssigkeit fast vollständig wieder voneinander trennen. Dieser in Abb. 7 dargestellte Sachverhalt ermöglichte später überhaupt erst die im Abschnitt 2.2.1. erläuterten "magnetischen Waschgänge" zur Entfernung nicht eingeschlossener Ferrofluid-Rückstände aus der Trägererythrozytensuspension.

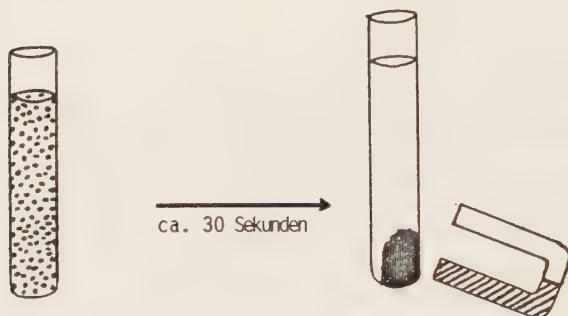


Abb. 7: Mit einem Magneten lassen sich gelöste Ferrofluidpartikel aus einer Lösung wieder abziehen (Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)).

2.3.1.2. Verhalten der Ferrofluids im Magnetfeld

Bringt man Ferrofluids in einer beliebigen Verdünnung in Aqua dest. oder einem Phosphatpuffer auf eine Petrischale auf, unter welcher ein starker Hufeisenmagnet angebracht ist, so ordnen sie sich nach wenigen Sekunden entlang der Feldlinien des Magnetfeldes an (Abb. 8); vgl. hierzu auch die Untersuchungen von Widder ([74]).



Abb. 8: a) homogen verteilte Ferrofluid-Lösung in einer Petrischale (Aufsicht)

b) nach wenigen Sekunden Anordnung der Magnetitpartikel entlang der Feldlinien des Magnetfeldes (Aufsicht)

Bringt man in die Nähe eines Reagenzglases, das Ferrofluids enthält, ein starkes Magnetfeld, so lagern sich die Magnetitpartikel, wie in Abb. 9 gezeigt, sogar entgegen der Schwerkraft an der Wand des Reagenzglases an.

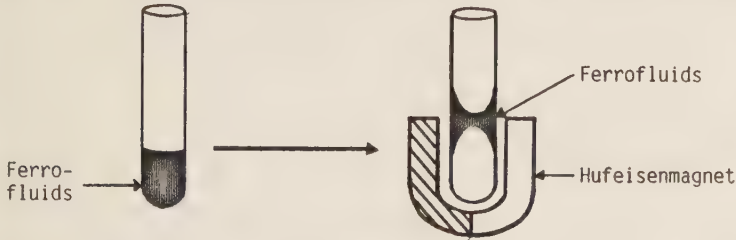


Abb. 9: Verhalten von Ferrofluids im Magnetfeld

2.3.1.3. Suszeptibilitätsmessungen und Aufstellen einer standardisierten Eichkurve für eine Verdünnungsreihe von Ferrofluids in Puffer I

Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) wurden mit Puffer I in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und für 60 Sekunden mit 50 kHz ultrabeschallt. Von dieser Ferrofluid-Lösung wurde durch weitere fortlaufende Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit Puffer I eine Verdünnungsreihe angelegt (Abb. 10).

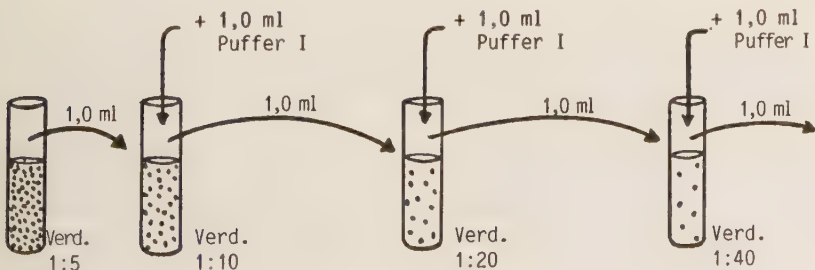


Abb. 10: Erstellung einer Verdünnungsreihe von Ferrofluids

Von jeder Verdünnungsstufe wurde die relative Suszeptibilität mehrfach und jeweils in mehreren Meßbereichen bestimmt und die arithmetischen Mittelwerte miteinander verglichen und graphisch dargestellt (Tab. 2; Abb.11).

Tab. 2: Meßwerte für die Suszeptibilitätsbestimmung der Ferrofluid - Verdünnungsreihe

Probe	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
Meßbereich I ($\chi_{5 \mu V}$)	Meßsignal für diesen Meßbereich zu groß					14,40	7,32	3,70
Meßbereich II ($\chi_{50 \mu V}$)		23,840	11,800	5,860	2,900	1,440		
Meßbereich III ($\chi_{200 \mu V}$)	11,640	5,900	2,950	Meßsignal für diesen Meßbereich zu klein				

Meßgenauigkeit: $\pm 0,03$ für Meßbereich I
 $\pm 0,006$ für Meßbereiche II und III

Als Ergebnisse dieser Versuchsreihe kann man folgende Aussagen formulieren:

1. Die theoretisch postulierte direkte Proportionalität zwischen Konzentration der Ferrofluids und relativer Suszeptibilität der Probe ließ sich im Rahmen der Meßgenauigkeit und Abfüllgenauigkeit der Präzisions-Eppendorfpipetten empirisch belegen.
2. Es ergaben sich praktisch identische Werte für die Suszeptibilität, wenn ein und dieselbe Probe in verschiedenen Meßbereichen des Lock-in-Verstärkers gemessen und der Meßwert des größeren Meßbereiches durch Multiplikation mit dem Unterschiedsfaktor beider Meßbereiche (in μV) auf den kleineren Meßbereich umgerechnet wurde.

Beispiel: Bei der Verdünnungsstufe 1:20 ergab die Messung der Probe im Meßbereich III ($\chi_{200 \mu V}$) einen Wert von 2,95. Im Meßbereich II ($\chi_{50 \mu V}$) betrug der Meßwert derselben Probe 11,80. Durch Multiplikation mit dem Faktor 4 kann man den Meßwert aus Meßbereich III exakt in den Meßwert aus Meßbereich II umrechnen (identische Ergebnisse).

Dieser problemlose Übergang von einem Meßbereich in einen anderen durch ein-

fache Multiplikation ermöglichte es, je nach Größe des elektrischen Signals jede Probe in dem für sie am besten geeigneten Meßbereich zu untersuchen und sie später, durch Umrechnung auf einen einheitlichen Meßbereich, doch mit anderen Proben vergleichen zu können. Die Wahl des optimalen Meßbereiches erhöhte die Meßgenauigkeit ganz erheblich, vor allem für Proben mit nur geringer Magnetisierung.

3. Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Ferrofluid-Konzentration und Suszeptibilitätswert einer Probe bestand die Möglichkeit, anhand der in Abb. 11 dargestellten Kurve auch unbekannte Konzentrationen von Ferrofluids zu bestimmen (Eichkurve).

Beispiel: Von einer unbekannten Probe wurde im Meßbereich III ($\chi_{200} \mu\text{y}$) eine Suszeptibilität von 7,5 gemessen. Umgerechnet auf den Meßbereich I ($\chi_5 \mu\text{y}$), welcher der Eichkurve zugrunde liegt, ergab sich ein Suszeptibilitätswert von 300,00. Nach Logarithmierung dieses Meßwertes erhält man: $\lg 300,00 = 8,23$. Einem Skalenwert von 8,23 auf der y-Achse der Eichkurve entspricht ein x-Wert von $|3,00|$. Nach Delogarithmieren des x-Wertes erhält man als gesuchte Verdünnungsstufe der Probe 1:8. Dieses Beispiel ist in Abb. 11 zur Verdeutlichung eingezeichnet.

Die exakte Proportionalität ermöglichte auch bei einer sehr geringen Ausbeute an Trägererythrozyten (z.B. infolge massiver Hämolyse) die Berechnung der Beladungsrate auf die Standardbezugsgröße von 0,5 ml einer Trägererythrozytensuspension, selbst wenn für die eigentliche Messung nur 0,1 ml Trägererythrozyten zur Verfügung standen.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß bei allen zukünftigen Messungen die Proben der Verdünnungsstufen 1:320 und 1:640 (die etwa im Bereich der bei den Trägererythrozyten zu erwartenden Suszeptibilitäten liegen) jeweils mit gemessen und als Qualitätskontrolle der Methode und zur Kontrolle der Arbeitsgenauigkeit herangezogen wurden.

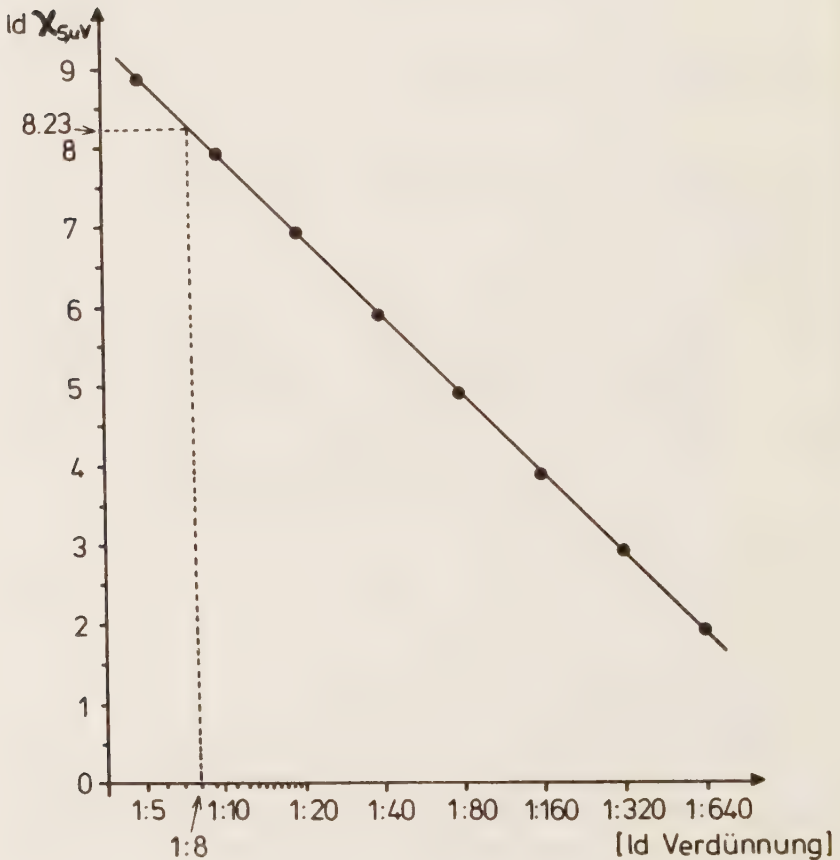


Abb. 11: Graphische Darstellung der Meßwerte aus Tab. 2 (Suszeptibilitätsbestimmung der Ferrofluid-Verdünnungsreihe). Alle Meßwerte wurden einheitlich auf den kleinsten Meßbereich ($\chi_{5 \mu V}$) umgerechnet.

Die Skalierung der x- und y-Achse erfolgte doppelt logarithmisch, weil eine lineare Auftragung der Meßwerte angesichts der großen Verdünnungsschritte ($1:5 = 0,2 \leftrightarrow 1:640 = 0,0015625$) und der großen Spannweite der Suszeptibilitätswerte (χ reicht von 3,7 bis 470,00) zu unübersichtlich geworden wäre oder ein über mehrere Seiten reichendes Format des Graphen erfordert hätte. Wegen der kontinuierlichen Halbierung der Konzentration wurde der Logarithmus dualis ($\lg x = \lg x / \lg 2$) gewählt.

2.3.1.4. Ergebnisse der Ultraschallung von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)

Wie bereits erwähnt, wurde bei Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) wegen des Fehlens jeglicher Detergentien eine rasche Konglomeratbildung beobachtet. Um wenigstens für die Dialysezeit, beim Einschluß der Ferrofluids in die Erythrozytenschatten, eine durchschnittliche Größe der Magnetitpartikel von 80 - 200 Å in etwa zu gewährleisten - größere Partikel können nicht oder nur in sehr geringem Umfang in Erythrozytenschatten eingeschlossen werden - wurden die Ferrofluids vor ihrer Verwendung auf die in Abschnitt 2.2.4.4. beschriebene Weise einer Behandlung mit Ultraschall unterzogen.

Notwendigkeit und Effektivität der Ultraschallung von Ferrofluids demonstrieren die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 12 und 13) recht deutlich: in Abb. 12 erkennt man große Magnetitkonglomerate, wie sie sich vor der Beschallung in den Ferrofluids gebildet hatten. Abb. 13 zeigt die gleichen Ferrofluids nach der Ultraschallung (50 kHz für 60 Sekunden): die Konglomerate haben sich weitgehend aufgelöst, die Magnetitpartikel sind in der Lösung relativ gleichmäßig verteilt.



Abb. 12: Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) ohne Ultraschallung.
JEOL JSM - 35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 5000-fach)

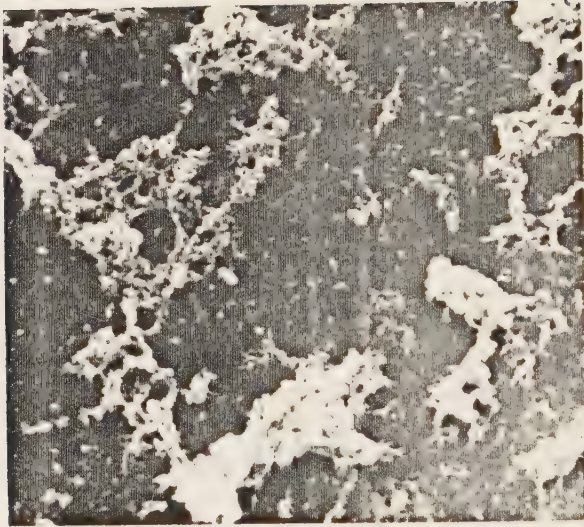


Abb. 13: Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) nach Ultraschallung.
JEOL JSM - 35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 5000-fach)

Um einen möglichen Einfluß der Ultraschallung auf die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) zu dokumentieren, wurde eine 1:5- Verdünnung von Ferrofluids mit Puffer I hergestellt und ihre Ausgangsuszeptibilität bestimmt. Anschließend wurden Proben der Ausgangslösung für unterschiedlich lange Zeiten mit jeweils 50 kHz beschallt. Wie man aus Tab. 3 und Abb. 14 entnehmen kann, änderte sich die Suszeptibilität nach unterschiedlich langen Beschallungszeiten nur geringfügig, wobei sich eine Tendenz zu Spitzenwerten bei mittleren Beschallungszeiten (40 - 100 Sekunden) zeigte.

Proben der gleichen Ausgangslösung wurden in einem zweiten Experiment für jeweils 60 Sekunden mit unterschiedlichen Ultraschallfrequenzen behandelt. Auch hier ergaben sich so gut wie keine Suszeptibilitätsunterschiede vor und nach der Beschallung (Tab. 4 und Abb. 15).

Aufgrund dieser Versuche wurde für alle folgenden Experimente die Beschallung der zu verwendenden Ferrofluids folgendermaßen standardisiert:

Beschallungszeit: 60 Sekunden

Frequenz des verwendeten Ultraschalls: 50 kHz

Tab. 3: Effekte unterschiedlich langer Beschallungszeiten auf die Suszeptibilität von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)

Beschallungszeit in [sec]	0	20	40	60	80	100	160	240	320
Suszeptibilität $\chi_{200 \mu V}$	11,23	11,45	11,15	11,50	11,41	11,52	10,95	10,80	11,00

Die Tabellenwerte sind Mittelwerte aus 3 verschiedenen Meßansätzen zu je 5 Messungen pro Meßansatz.

Meßgenauigkeit: $\pm 0,04$

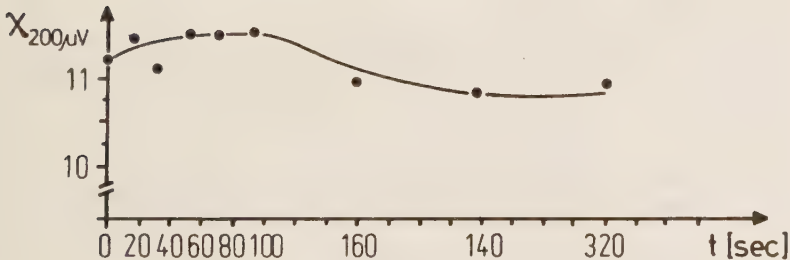


Abb. 14: Graphische Darstellung der Effekte unterschiedlich langer Beschallungszeiten auf die Suszeptibilität von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)

Tab. 4: Effekte verschiedener Ultraschallfrequenzen auf die Suszeptibilität von Ferrofluids EMG 1111 (B10-I)

Ultraschallfrequenz [kHz]	ohne Beschallung	30	40	50	60
Suszeptibilität 200 μ V	11,23	11,24	11,30	11,48	11,45

Die Tabellenwerte sind Mittelwerte aus 3 verschiedenen Meßansätzen zu je 5 Messungen pro Meßansatz

Meßgenauigkeit: $\pm 0,04$

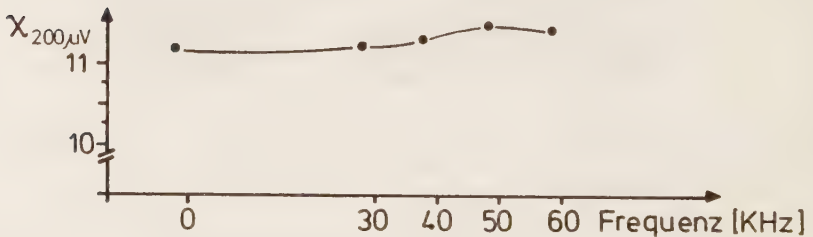


Abb. 15: Graphische Darstellung der Effekte verschiedener Ultraschallfrequenzen auf die Suszeptibilität von Ferrofluids EMG 1111 (B10-I)

2.3.1.5. Einfluß von Inhaltsstoffen der Erythrozyten auf die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids

Da die Beladungsrate der Trägererythrozyten über die Suszeptibilität der in ihnen eingeschlossenen Ferrofluids gemessen werden sollte, mußte vorab noch geklärt werden, ob die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids durch ihren Einschluß in Erythrozytenschatten verändert werden können, beispielsweise durch intrazelluläre Enzym- oder Redoxsysteme, welche die Zusammensetzung des Komplexkristalls Magnetit stören, oder durch son-

stige Wechselwirkungen der Ferrofluids mit irgendwelchen in den Erythrozyten vorkommenden Substanzen.

Zu diesem Zweck wurde je 1,0 ml reiner Ferrofluids einmal zusammen mit 3,0 ml Aqua dest., zum anderen zusammen mit 3,0 ml eines Hämolysates für 2 Stunden bei + 22° C auf einem Rotator inkubiert. Das Hämolysat war durch Hämolyse frisch gewaschener Erythrozyten mit Aqua dest. gewonnen worden und enthielt demnach alle Inhaltsstoffe der Erythrozyten.

Nach 2 Stunden wurden aus beiden Testansätzen mehrere gleich große Proben entnommen und darin die Suszeptibilität bestimmt. Es zeigte sich, daß die magnetischen Eigenschaften der Ferrofluids in keiner Weise von den Inhaltsstoffen der Erythrozyten beeinflußt werden (Tab. 5).

Tab. 5: Suszeptibilität von mit Aqua dest. oder Erythrozytenhämolysat inkubierten Ferrofluids EMG 1111 (B10-I)

Mit Aqua dest. inkubierte Ferrofluids	Suszeptibilität $\chi_{100 \mu V}$
Probe 1	13,17
Probe 2	13,37
Probe 3	13,13
	Mittelwert: 13,22
Mit Erythrozytenhämolysat inkubierte Ferrofluids	Suszeptibilität $\chi_{100 \mu V}$
Probe 1	13,52
Probe 2	13,37
Probe 3	13,38
	Mittelwert: 13,42

Der geringe Unterschied zwischen den mit Aqua dest. und den mit Erythrozytenhämolysat inkubierten Ferrofluids ist statistisch nicht signifikant und im Rahmen der Abfüllgenauigkeit der Proben und der Meßgenauigkeit ($\pm 0,05$) erklärlich.

2.3.1.6. Chemische Analyse der Ferrofluids

Die quantitative chemische Analyse der Ferrofluids durch das Mikroanalytische Labor des Instituts für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ergab neben den zu erwartenden Elementen Eisen (Fe), Wasserstoff (H_2) und Sauerstoff (O_2) in den entsprechenden Gewichtsanteilen auch noch 0,5 - 1,0 Gew% Kohlenstoff (C). Dies überraschte umso mehr, als der Hersteller versicherte, Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) enthielten nur Magnetitpartikel (Fe_3O_4) in Aqua dest. (H_2O). Die in der Analyse gefundenen geringen Anteile von Kohlenstoff erklärte der Hersteller mit einer gewissen Absorption von Kohlendioxid (CO_2) aus der Luft durch die Eisenverbindung des Magnetit.

Eine weitere Schwierigkeit beim Einsatz der Ferrofluids bringt die Tatsache mit sich, daß Ferrofluids ohne Lösungsmittelzusatz vom Hersteller wegen der großen Agglomerationsneigung der Magnetitpartikel nicht in einer vollkommen standardisierten und gleichbleibenden Zusammensetzung sowie konstanter Partikelgröße geliefert werden können. Demzufolge wurden auch mit Ferrofluids der gleichen chemischen Aufbereitung (nach den Vorversuchen kamen nur noch Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) zum Einsatz), aber aus verschiedenen Lieferungen ganz unterschiedliche Beladungsraten erzielt und unterschiedliche zytotoxische Aktivitäten beobachtet.

Da die Zytotoxizität der Ferrofluids teilweise durch mehrfaches Waschen mit Aqua dest. deutlich reduziert werden konnte, bleibt, unter Berücksichtigung des Ergebnisses der chemischen Analyse, ein gewisser Zweifel bestehen, ob nicht doch, entgegen den Angaben des Herstellers, geringe Mengen organischer Lösungsvermittler auch in Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) vorhanden sind. Die Anwesenheit solcher Substanzen würde die Zytotoxizität der Ferrofluids zumindest teilweise erklären.

2.3.2. Einfluß verschiedener Parameter auf die Beladungsrate der Trägererythrozyten

Mit der in Kapitel 2.2.1. beschriebenen Methode zur Herstellung von Trägererythrozyten wurden Beladungsraten zwischen 3% und 15% der zum Einschluß angebotenen Menge von Magnetitpartikeln erreicht. Damit liegt die Beladungsrate für Ferrofluids erheblich niedriger als die bisher mit anderen Substanzen erzielten Einschlußquoten (vgl. [61]). Die relativ große Spanne bei der Beladungsrate beruht sicher zum Teil auf der oben beschriebenen uneinheitlichen Zusammensetzung der Ferrofluids.

Im folgenden sollte geklärt werden, in wie weit andere Parameter einen Einfluß auf das Ausmaß der Beladung von Trägererythrozyten mit Ferrofluids haben und wie man diese Parameter optimal gestalten kann, um möglichst hohe Einschlußquoten zu erzielen.

2.3.2.1. Magnetische Eigenschaften unbeladener Erythrozyten und Suszeptibilitäten verschiedener Leerproben

Wurden gewaschene, aber ansonsten unbehandelte Erythrozyten einem starken äußeren Magnetfeld ausgesetzt, so ließ sich makroskopisch und lichtmikroskopisch keine Beeinflussung der Erythrozyten durch dieses Magnetfeld feststellen. Die Erythrozyten wanderten weder zu den Polen des Magneten, noch richteten sie sich entlang der Feldlinien aus. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Kondorsky et al., die, allerdings unter Verwendung noch wesentlich stärkerer Magneten, nur eine minimale Beschleunigung von gleichförmig bewegten Erythrozyten in der Nähe der Polen eines Magneten beschrieben ([37]).

In einem zweiten Schritt wurde die Suszeptibilität von gewaschenen, aber ansonsten unbehandelten Erythrozyten bestimmt. Weit über 20 unabhängige Messungen ergaben stets einen Wert für die relative Suszeptibilität von $\chi_{5 \mu V} = \pm 0,00$, das heißt unbehandelte Erythrozyten zeigten in der hier gewählten Meßanordnung und im Rahmen einer Meßgenauigkeit von $\pm 0,03$ keinerlei magnetische Suszeptibilität (Tab. 6).

Zusätzlich wurden noch die Suszeptibilitäten von verschiedenen Leerpro-

Tab. 6: Suszeptibilitätswerte verschiedener Leerproben

Art der Probe	Suszeptibilität $\chi_5 \mu V$
gewaschene unbehandelte Erythrozyten (0,5 ml)	$\pm 0,00$
leeres Reagenzglas	- 0,03
Aqua dest. (0,5 ml)	- 0,07
Puffer I (0,5 ml)	- 0,06
Puffer I* (0,5 ml)	- 0,06
Puffer II (0,5 ml)	- 0,06

} leicht
diamagnetisch

Meßgenauigkeit: $\pm 0,03$

ben gemessen, so von den zur Suszeptibilitätsmessung verwendeten Reagenzgläsern, Aqua dest. und den Phosphatpuffern (Tab. 6). Es fanden sich ganz geringe negative Suszeptibilitätswerte, das heißt die Leerproben waren ein wenig diamagnetisch. Im Rahmen der Meßgenauigkeit sind diese diamagnetischen Eigenschaften aber vernachlässigbar klein im Vergleich zu den großen Suszeptibilitätswerten der Ferrofluids. Sie stellen jedoch eine Erklärung dafür dar, daß ich bei meinen Messungen von unbehandelten Erythrozyten überhaupt keine Suszeptibilität feststellen konnte, während Kondorsky et al. geringe magnetische Suszeptibilitäten fanden ([38]): die zur Messung verwendeten Reagenzgläser und Medien haben durch die ihnen eigene geringe negative Suszeptibilität die geringe positive Suszeptibilität der Erythrozyten gerade auf.

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse war keine Verfälschung der Meßwerte durch die zur Messung verwendeten Reagenzgläser oder Medien zu befürchten.

2.3.2.2. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Art der eingesetzten Ferrofluids

Am Rande sei erwähnt, daß in Vorversuchen auch noch andere Magnetitaufbereitungen als die später ausschließlich verwendeten Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) erprobt wurden. Alle anderen Ferrofluids (z.B. EMG 805 und EMG 807) enthalten aber Lösungsvermittler wie Ölsäure. Sie erwiesen sich als so zytotoxisch für die Erythrozyten, daß entweder eine totale Hämolyse resultierte und überhaupt keine Ausbeute an beladenen Zellen erzielt werden konnte, oder daß die wenigen noch verbliebenen Zellen bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen stärkste morphologische Veränderungen aufwiesen. Solche Veränderungen haben schon Rumsby et al. 1979 beschrieben ([55]).

Aber auch die Trägererythrozyten, die mit Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) aus verschiedenen Lieferungen beladen worden waren, zeigten große Unterschiede hinsichtlich der Beladungsrate, der Restverunreinigung der Kontrollansätze und der Zytotoxizität. Dabei korrelierten erhöhte Zytotoxizität, verminderte Einschlußquoten und stärkere Restverunreinigung positiv miteinander; offensichtlich haben zytotoxischere Ferrofluids infolge ihrer membranschädigenden Wirkungen eine höhere Affinität zur Außenmembran der Erythrozyten und lassen sich deswegen im Waschgang schlechter aus der Zellsuspension eliminieren. Als Beispiel für die unterschiedlichen Eigenschaften der gleichen Ferrofluids aus verschiedenen Lieferungen seien in Tab. 7 zwei Extreme aufgeführt. Interessanterweise ließen sich die schlechten Beladungsergebnisse mit Lieferung B durch mehrmaliges Waschen der Ferrofluids mit Aqua dest. wieder auf gewohnte Werte anheben. Die Restverunreinigung der Kontrollzellen blieb aber nach wie vor hoch. Trotzdem spricht die Tatsache, daß sich die Beladungsrate durch einfaches "Waschen" der Magnetitsuspension verbessern ließ, dafür, daß die Ferrofluids wohl doch, wenn auch in geringen Mengen, weitere Stoffe außer Magnetit und Wasser enthalten, die dann beim Waschen zunehmend entfernt werden können.

Ebenfalls in diese Richtung weisen Ergebnisse, die beim wiederholten Einsatz von schon einmal zur Beladung von Erythrozytenschatten verwendeten Ferrofluids erzielt wurden. Da ja nur jeweils maximal 15 % der angebotenen Ferrofluidmenge tatsächlich in Erythrozyten eingeschlossen wurden, war es möglich, die restlichen Magnetitpartikel aus den Zentrifugenröhrchen

Tab. 7: Beladungsraten bei Verwendung von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) aus verschiedenen Lieferungen, zunächst ohne jegliche Vorbehandlung, dann nach mehrfachem Waschen in Aqua dest.

Ferrofluids, die zur Beladung von Trägererythrozyten eingesetzt wurden	Ferrofluids aus Lieferung A		Ferrofluids aus Lieferung B	
	ohne Waschen in Aqua dest.	nach Waschen in Aqua dest.	ohne Waschen in Aqua dest.	nach Waschen in Aqua dest.
$\chi_{5 \mu V}$ der angebotenen Ferrofluidlösung (0,5 ml)	401,80	401,60	460,00	461,20
$\chi_{5 \mu V}$ der beladenen Trägererythrozyten (0,5 ml)	0,92	6,96	2,10	8,98
$\chi_{5 \mu V}$ der Kontrollzellen (= Restverunreinigung)	0,31	2,10	0,41	0,43
Beladungsrate in [%]	0,6	4,9	1,5	7,4

Meßgenauigkeit: $\pm 0,03$

Tab. 8: Unterschiedliche Beladungsraten bei Verwendung von frisch vom Hersteller gelieferten Ferrofluids und Ferrofluids, die in früheren Versuchen schon einmal eingesetzt und nach ihrer Rückgewinnung mehrfach in Aqua dest. gewaschen worden waren

Eingesetzte Ferrofluids	frische Ferrofluids	bereits verwendete Ferrofluids
$\chi_{5 \mu V}$ der Ferrofluids	520,00	189,00
$\chi_{5 \mu V}$ der Trägererythrozyten	4,30	9,30
$\chi_{5 \mu V}$ der Kontrollansätze	1,20	1,85
Beladungsrate in [%]	2,4	15,6

Meßgenauigkeit: $\pm 0,03$

und den Waschüberständen wieder zurückzugewinnen. Wenn solche Ferrofluids nach vielfachem Waschen in Aqua dest. erneut zur Beladung von Erythrozytenschatten eingesetzt wurden, lagen die Beladungsraten in der Regel höher als bei Verwendung frisch vom Hersteller gelieferter Ferrofluids (Tab. 8).

Aufgrund dieser Resultate wurden die Ferrofluids später vor ihrem Einsatz zur Beladung von Erythrozytenschatten stets mehrfach in einem Reagenzglas mit Aqua dest. aufgeschüttelt und danach wieder mit einem Hufeisenmagneten abgezogen (vgl. Abb. 7, S. 34), wobei der Überstand jedesmal verworfen wurde. Auf diese Weise ließ sich die Beladungsrate meist auf wenigstens 5 % anheben, und auch die Zytotoxizität und die damit verbundenen morphologischen Alterationen der Trägererythrozyten konnten gesenkt werden.

2.3.2.3. Abhängigkeit der Beladungsrate von Dauer und Frequenz der Ferrofluid - Ultraschallung

Im Abschnitt 2.3.1.4. wurde gezeigt, daß die Eigenssuszeptibilität der reinen Ferrofluids nach unterschiedlich langen Beschallungszeiten in etwa konstant bleibt, mit einer leichten Tendenz zu Spitzenwerten bei mittleren Beschallungszeiten zwischen 40 und 100 Sekunden. Das gleiche gilt für die Eigenssuszeptibilität der Ferrofluids bei Anwendung verschiedener Ultraschallfrequenzen.

Wenn unterschiedlich lange beschallte Ferrofluids in Erythrozyten eingeschlossen wurden, verhielten sich die Suszeptibilitäten dieser Trägererythrozyten (und damit die Beladungsraten) ähnlich: Ohne jegliche Ultraschallung wurde nur eine sehr geringe Beladungsrate erzielt, weil die großen Magnetitkonglomerate nicht aufgelöst worden waren. Bereits nach einer kurzen Beschallungszeit von 20 Sekunden stieg die Beladungsrate sprunghaft an und blieb dann nahezu gleich, ebenfalls mit einer Tendenz zu Spitzenwerten im Bereich mittlerer Beschallungszeiten (Tab. 9; Abb. 16).

Tab. 9: Einfluß der Beschallungszeit auf die Beladungsrate (Suszeptibilität) der Trägererythrozyten

Beschallungszeit [sec]	0	20	40	60	80	100	120	160	240
$\chi_{5\mu V}$ der Trägererythrozyten	1,72	3,15	3,60	3,80	3,60	3,55	3,50	3,50	3,45

Meßgenauigkeit: $\pm 0,03$

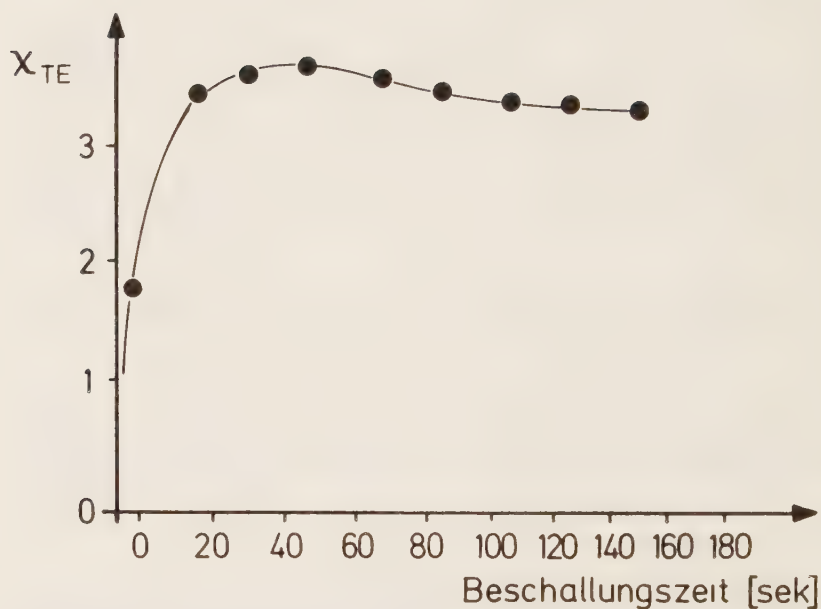


Abb. 16: Einfluß der Beschallungszeit auf die Beladungsrate der Trägererythrozyten (TE), ausgedrückt durch χ_{TE} .

Die Beladungsrate beim Einsatz von Ferrofluids, bei denen die Beschallungszeit konstant gehalten wurde (60 Sekunden), aber die Frequenzen des Ultraschalls variierten, zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab. 10).

Tab. 10: Einfluß unterschiedlicher Ultraschallfrequenzen auf die Beladungsrate (Suszeptibilität) der Trägererythrozyten

Frequenz des verwendeten Ultraschalls [kHz]	30	40	50	60
$\chi_{5 \mu V}$ der Trägererythrozyten ($\pm 0,03$)	3,65	3,60	3,65	3,65

Für die weiteren Experimente wurde eine Beschallungszeit von 60 Sekunden bei einer Frequenz von 50 kHz beibehalten, da in diesem Bereich die höchsten Suszeptibilitäten gemessen werden konnten, was für die Genauigkeit der Messungen von Vorteil ist, weil sich größere Signale auch besser messen lassen.

Die tatsächliche Beladungsrate ist wahrscheinlich bei allen Frequenzen und Beschallungszeiten etwa gleich, und es kommt nur darauf an, daß die Ferrofluids vor ihrem Einsatz überhaupt mit Ultraschall behandelt werden, um die großen Konglomerate aufzulösen und den Magnetitpartikeln ihre ursprüngliche Größe zurückzugeben. Die höheren Suszeptibilitäten der Trägererythrozyten bei mittleren Beschallungszeiten, die eine erhöhte Beladungsrate vortäuschen könnten, kommen wohl eher durch die im entsprechenden Beschallungsbereich ebenfalls erhöhten Ausgangssuszeptibilitäten der Ferrofluids zustande. Im übrigen wären bei den großen Unterschieden von den Beladungsraten, die allein durch die uneinheitliche Zusammensetzung der Ferrofluids bedingt sind, eventuelle minimale Beladungsunterschiede durch die Art der Beschallung ohnehin bedeutungslos.

2.3.2.4. Abhängigkeit der Beladungsrate von der Konzentration der im Außenmedium angebotenen Ferrofluids

Wurden die Erythrozyten während der Dialyse sehr hohen Konzentrationen von Ferrofluids ausgesetzt, resultierten stark hämolytische Waschüberstände, große Zellverluste bis hin zu 100 %iger Hämolyse und demzufolge nur sehr geringe Einschlußquoten ($< 1\%$). Bei sehr niedrigen Ferrofluidkonzentrationen war die Hämolyse rate zwar erheblich geringer (maximal 40 %), aber die Beladungsraten erreichten auch nur maximal 1 - 2 %.

Die besten Ergebnisse erzielte man bei Konzentrationen von 25 Vol% bzw. 16,6 Vol% Ferrofluids in Puffer I (also 1 Volumenteil Ferrofluids + 3 bzw. 5 Volumenteile Puffer I). Zwar mußten bei diesen Konzentrationen immer noch eine Hämolyse rate im Bereich von 50 - 60 % des Ausgangszellvolumens und auch zum Teil ganz erhebliche morphologische Veränderungen der verbliebenen Zellen (vgl. Kapitel 2.3.3.) in Kauf genommen werden, aber das Ausmaß der Beladung erreichte immerhin Werte zwischen 6 % und 10 %. Mit bereits mehrfach vorgewaschenen und beschallten Ferrofluids konnten vereinzelt sogar Einschlußquoten bis zu 15 % gefunden werden, wobei zu beachten ist, daß

mehrfach vorgewaschene und beschallte Ferrofluids wesentlich weniger dicht gepackt sind, als unbehandelte. Da aber die Beladungsrate immer als Prozentsatz der angebotenen Menge an Magnetitpartikeln ausgedrückt wird, könnten die besseren Resultate mit vorbehandelten Ferrofluids zum Teil auf die etwas geringere Menge der angebotenen Ferrofluids zurückzuführen sein.

Überhaupt gilt es bei dieser Fragestellung folgendes zu beachten:
Das Volumen eines normalen Erythrozyten beträgt im Durchschnitt $86 \mu\text{m}^3 = 86 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3$. Geht man davon aus, daß das Volumen von Trägererythrozyten etwas geringer ist und daß maximal 2/3 dieses Volumens zur Beladung mit Ferrofluids zur Verfügung stehen (vgl. Arbeiten von Sprandel et al., vor allem [66] und [68]), dann kann man das für die Beladung freie Volumen pro Erythrozyt mit ungefähr $50 \mu\text{m}^3 = 50 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3$ angeben. In 1,0 ml Trägererythrozytensuspension stehen dann, je nach Hämatokrit, 0,2 bis 0,3 ml intrazelluläres Volumen für den Einschluß von Magnetitpartikeln zur Verfügung, das heißt die Kapazität des Trägers ist aus stöchiometrischen und volumenmäßigen Gründen beschränkt. Das bedeutet, daß im Bereich sehr kleiner Ferrofluid-Konzentrationen im Außenmedium mit der Konzentrationserhöhung auch die Beladungsrate ansteigen wird. Ab einer bestimmten Ferrofluid-Konzentration ist aber die maximale Beladungskapazität der Trägererythrozyten erreicht. Dieser Grenzwert liegt bei 15 - 25 Vol% Ferrofluids im Dialyseschlauch. Erhöht man die Konzentration darüber hinaus, so nimmt nicht nur die Hämolyserate der Zellen während der Beladung erheblich zu, sondern gleichzeitig muß auch die Beladungsrate (als Prozentsatz der angebotenen Ausgangsmenge an Ferrofluids) wieder abnehmen, da mehr Magnetitpartikel angeboten werden, ohne daß die Trägererythrozyten noch mehr aufnehmen könnten.

Diese Überlegungen sollte man bei der Bewertung der in Tab. 11 wiedergegebenen Beladungsraten in Abhängigkeit von der Ferrofluidkonzentration berücksichtigen. Für alle weiteren Versuche wurde natürlich trotzdem die Konzentration von 25 Vol% Ferrofluids im Außenmedium beibehalten, da mit ihr eindeutig die besten Einschlußresultate erzielt worden waren.

Tab. 11: Einfluß der Ferrofluidkonzentration im Außenmedium auf die Beladungsrate der Trägererythrozyten

Konzentration der Ferrofluids [Vol%]	>50	50	25	16,6	12,5	6,0
Beladungsrate [%]	0	0,5-2	6 - 10	2-8	1 - 3	< 1

2.3.2.5. Abhängigkeit der Beladungsrate vom Hämatokrit des Präparationsansatzes in den Dialyseschläuchen

Über den Einfluß des Hämatokrits im Präparationsansatz (d.h. den Volumenanteil von roten Blutkörperchen, die zusammen mit der einzuschließenden Substanz und Puffer I in die Dialyseschläuche abgefüllt werden) auf die Höhe der Beladung haben Dale et al. ([10]) und Sprandel et al. ([61]) ausführlich berichtet.

In einer Versuchsreihe, die mit Ferrofluids aus einer Lieferung durchgeführt wurde, um eventuelle, durch die Ferrofluids selbst bedingte unterschiedliche Beladungsraten auszuschließen, wurden drei verschiedene Hämatokrits in den Dialyseschläuchen erprobt: 66 %, 75 %, 80 %. Bei Hämatokrits über 80 % ist die Viskosität der Zellsuspension so groß, daß die Beladungsraten, vor allem beim Einschluß der ebenfalls zähflüssigen Ferrofluids, rasch auf Werte unter 3 % absinken.

Die besten Einschlußquoten wurden bei einem Hämatokrit von 75 % erzielt, so daß dieser Wert für die weiteren Experimente beibehalten wurde.

2.3.2.6. Abhängigkeit der Beladungsrate von weiteren Parametern

Bezüglich der Abhängigkeit der Beladungsrate von der Dialysezeit, der Temperatur und dem pH-Wert fanden sich keine Unterschiede zu den Ergebnissen der umfangreichen früheren Untersuchungen von Sprandel et al. ([61], [63], [64], [66], [68]). Die dort diesbezüglich erarbeiteten optimalen Präparationsbedingungen wurden unverändert übernommen.

Nach Abschluß der Vorversuche und der Experimente zum Einfluß verschiedener Parameter auf die Beladungsrate von ferromagnetischen Trägererythrozyten konnten die Präparationsbedingungen unter Berücksichtigung aller gewonnenen Erkenntnisse optimal gestaltet und die Methode zur Herstellung ferromagnetischer Trägererythrozyten für die späteren Versuche standardisiert werden. Einen zusammenfassenden Überblick über die standardisierte Präparationsmethode gibt Tab. 12.

Tab. 12: Übersicht über die standardisierte Präparationsmethode für ferromagnetische Trägererythrozyten

Erythrozyten	zweimal für <u>15 Minuten</u> in Puffer I gewaschen <u>Temperatur: + 4° C</u> ; <u>Zentrifuge: 530 g</u>
Ferrofluids	ausschließlich <u>Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)</u> vor Verwendung: a) mehrfaches Waschen in Aqua dest. (vgl. 2.3.2.2.) b) gewaschene Ferrofluids im Verhältnis 1:4 mit Puffer I mischen $\Rightarrow$ <u>25 Vol%iges Ferrofluid-Puffer - Gemisch</u> c) <u>Ultraschallung</u> des Ferrofluid-Puffer-Gemisches für <u>60 Sekunden</u> mit <u>50 kHz</u> bei <u>$\pm 0^\circ \text{ C}$</u>
Präparationsansatz im Dialyseschlauch	Vorbehandeltes Ferrofluid-Puffer-Gemisch (25 Vol%) gewaschene Erythrozyten } $\rightarrow$ 1 Volumen- teil } $\rightarrow$ 3 Volumen- teile } Hämatokrit: 75 %
Dialysebedingungen	<u>Aufschluß der Zellen: 75 Minuten bei + 4° C</u> <u>Verschuß der Zellen: 60 Minuten bei + 37° C</u> <u>pH = 7,4</u>
Waschen der gewonnenen Trägererythrozyten	a) Aufschütteln der Trägererythrozyten mit Puffer I* und anschließendes Zentrifugieren (20 Minuten, + 20° C, 530 g) b) 10 Minuten "magnetische Reinigung" der Trägererythrozyten (vgl. 2.2.1.)
4 x wiederholt	

2.3.3. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie von mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten

Selbst bei schonendster Präparation und günstigsten Bedingungen ließ sich die Verlustrate an Zellen durch Hämolysen während des Beladungsvorgangs kaum unter 50 % senken; das heißt um etwa 10 ml einer Zellsuspension beladener Trägererythrozyten zu erhalten, mußten 20 - 30 ml einer Erythrozytensuspension als Ausgangszellmenge eingesetzt werden. Zwar haben Trägererythrozyten ein etwas geringeres Volumen als normale rote Blutkörperchen (vgl. [66]), aber trotzdem zeigen diese Zahlen doch recht deutlich die beachtliche hämolytische und zytotoxische Aktivität der Ferrofluids. Hämolysen, also die totale Zerstörung von roten Blutkörperchen, ist makroskopisch sichtbar; über die mikroskopischen Membranveränderungen bei den verbliebenen Zellen sollten die folgenden Untersuchungen Aufschluß geben.

2.3.3.1. Methodische Vorbemerkungen

Die Herstellung der REM-Präparate wurde bereits ausführlich beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.3.).

Die fertigen Präparate wurden zunächst in der Übersichtsvergrößerung von 200- bis 500-facher Vergrößerung untersucht. Anschließend wurden bei 1000-facher Vergrößerung jeweils 50 Gesichtsfelder (ca. 2500 Zellen) ausgezählt und der prozentuale Anteil der einzelnen gefundenen Zelltypen an der Gesamtzahl ermittelt. Schließlich wurden bei 10 000-facher Vergrößerung noch typische Zellformen aufgesucht und fotografisch dokumentiert.

2.3.3.2. Morphologie der gemäß standardisierter Präparationsmethode hergestellten Trägererythrozyten

Von den mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten traten nur etwa 10 bis maximal 20 % als bikonkave Diskozyten (Abb. 19) in Erscheinung, das heißt konnten grobmorphologisch als "normale" oder geringgradig alterierte Zellen betrachtet werden. Die übrigen Zellen boten ein breites Spektrum aller nur denkbaren pathologischen Formen, von Stoma-

tozyten (Abb. 20) und Echinozyten (= Stechapfelform; Abb. 21) über multikonkave Sphärozyten z.T. mit rauher Oberfläche (Abb. 22) und Anulozyten (Abb. 23) bis hin zu Klumpen unförmig zusammengebackener Zellen mit zahlreichen Einstülpungen und Einziehungen (Abb. 24) und zerfetzten Zellmembranfragmenten (Abb. 25), die kaum mehr als Erythrozyten zu erkennen waren.

Einen Überblick über den prozentualen Anteil der einzelnen Zellformen an der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen gibt Tab. 13. Dabei ist jeweils sowohl die Bandbreite der Verteilung innerhalb der gefundenen Extremwerte als auch der mathematische Mittelwert aus allen ausgezählten Gesichtsfeldern angegeben. Da Zellen aus verschiedenen Präparationen untersucht wurden, bei denen alle möglichen Einflüsse eine Rolle spielten (z.B. Ferrofluids aus verschiedenen Lieferungen usw.), geben die Verteilungsbereiche eigentlich ein aussagekräftigeres Bild von den bei jeder einzelnen Präparation unterschiedlichen Anteilen der diversen Zellformen an der Gesamtzahl, als die errechneten Mittelwerte.

Tab. 13: Verteilung der einzelnen Zellformen bei mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten

Bikonkave Zellen	10 - 20 % (Mittelwert: 15 %)
Stomatozyten	5 - 20 % (Mittelwert: 14 %)
Echinozyten (Stechapfelform)	2 - 12 % (Mittelwert: 5 %)
multikonkave Sphärozyten	25 - 35 % (Mittelwert: 30 %)
Anulozyten	0 - 2 % (Mittelwert: 1 %)
stark deformierte Formen (Zellklumpen, Einziehungen, Lochbildungen, Zellmembranfragmente)	30 - 45 % (Mittelwert: 35 %)

Betrachtete man hingegen gewaschene, aber sonst unbehandelte Erythrozyten oder die isoosmolar dialysierten Kontrollzellen im Rasterelektronenmikroskop, fanden sich durchwegs 80 - 90 % bikonkave, normal

konfigurierte Zellformen, was mit den Ergebnissen der morphologischen Studien von Sprandel et al. ([66]) übereinstimmt und zeigt, daß die mißgebildeten Zellformen bei den Trägererythrozyten nicht etwa auf die Herstellungsweise der Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie zurückzuführen sind, sondern tatsächlich durch die Beladung mit Ferrofluids verursacht wurden. Abb. 17 und Abb. 18 vermitteln einen optischen Eindruck von der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Zellformen bei Trägererythrozyten und unbeladenen Kontrollzellen anhand zweier ausgewählter Gesichtsfelder.



Abb. 17: Morphologische Vielfalt von mit Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten in einem ausgewählten repräsentativen Gesichtsfeld. Man erkennt die in Abb. 19 bis Abb. 25 photographisch dokumentierten typischen Zellformen in einer etwa Tab. 13 entsprechenden prozentualen Verteilung.

JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung 1000-fach)

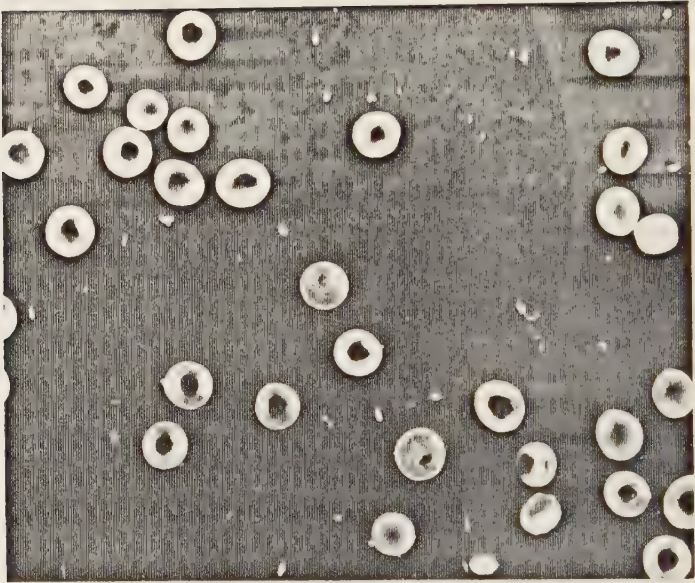


Abb. 18: Unbeladene Kontrollzellen in einem repräsentativen Gesichtsfeld
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 1000-fach)

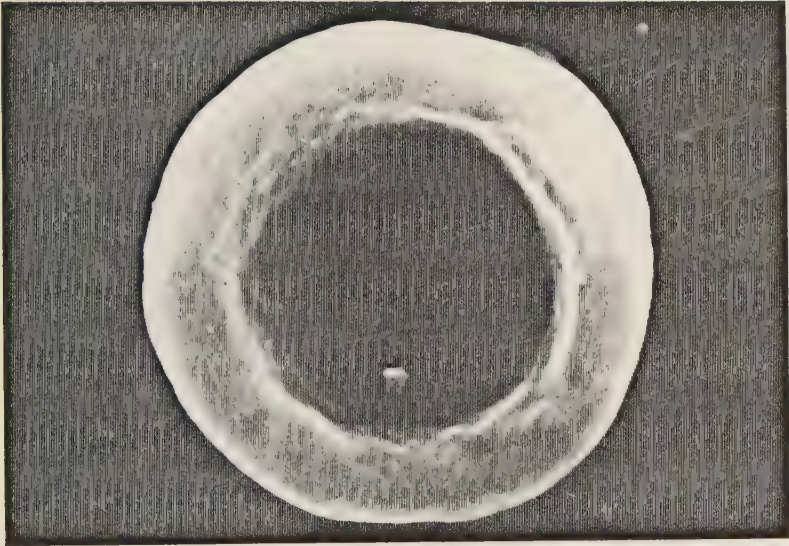


Abb. 19: Bikonkaver Diskozyt ("normal" konfigurierter Erythrozyt)
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

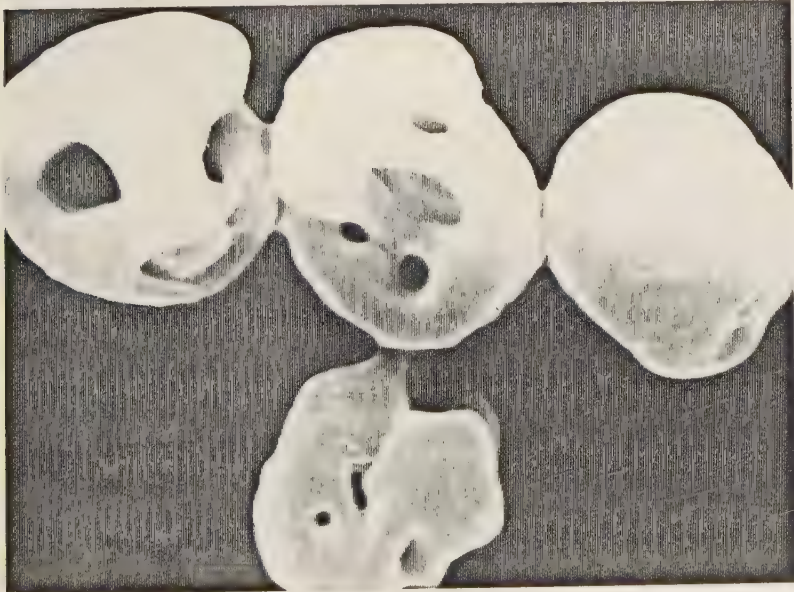


Abb. 20: Gruppe von Stomatozyten (Zellen mit einem oder mehreren zentralen "Löchern")
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

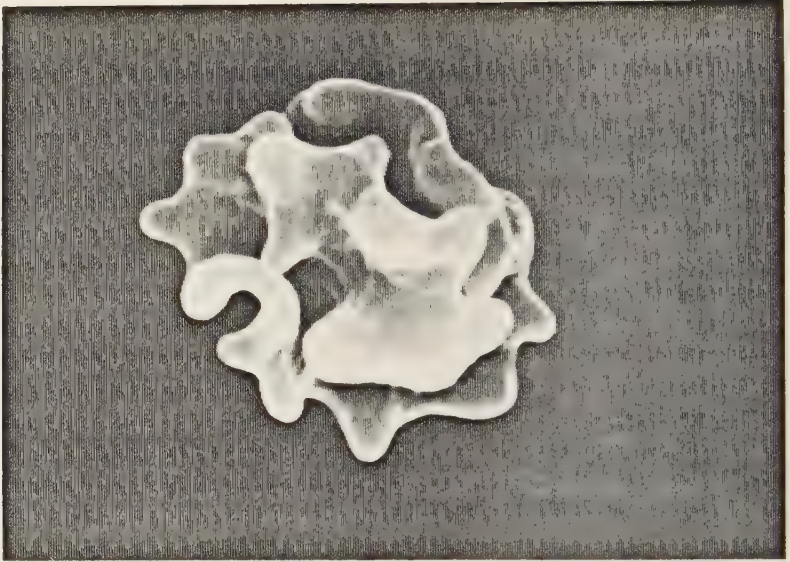


Abb. 21: Echinozyt (Stechapfelform)
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

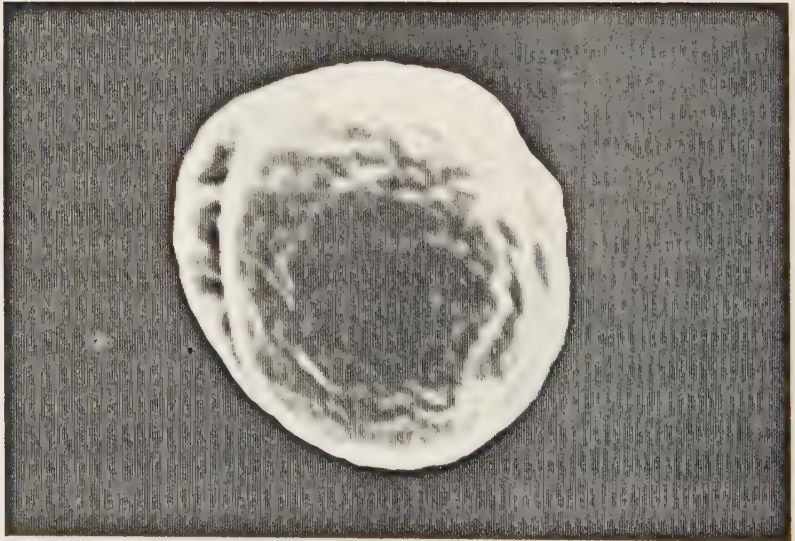


Abb. 22: Multikonkaver Sphärozyt mit rauher Zelloberfläche
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

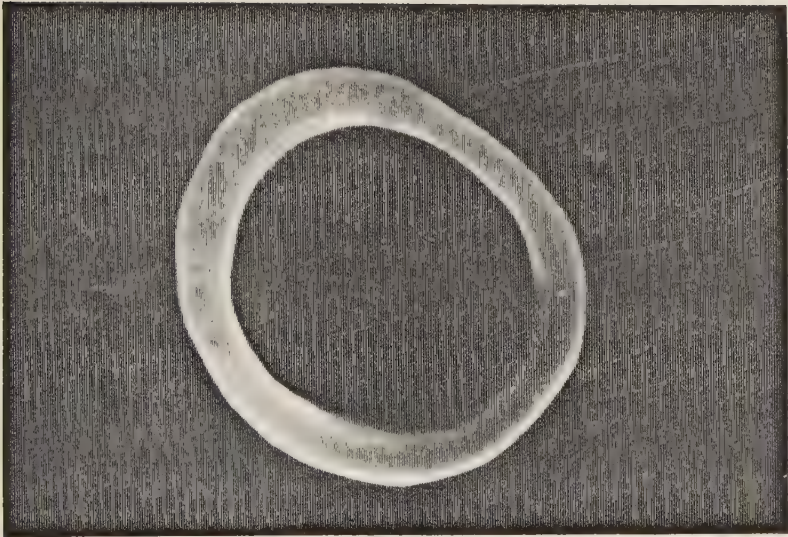


Abb. 23: Anulozyt (ringförmige Zelle)
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

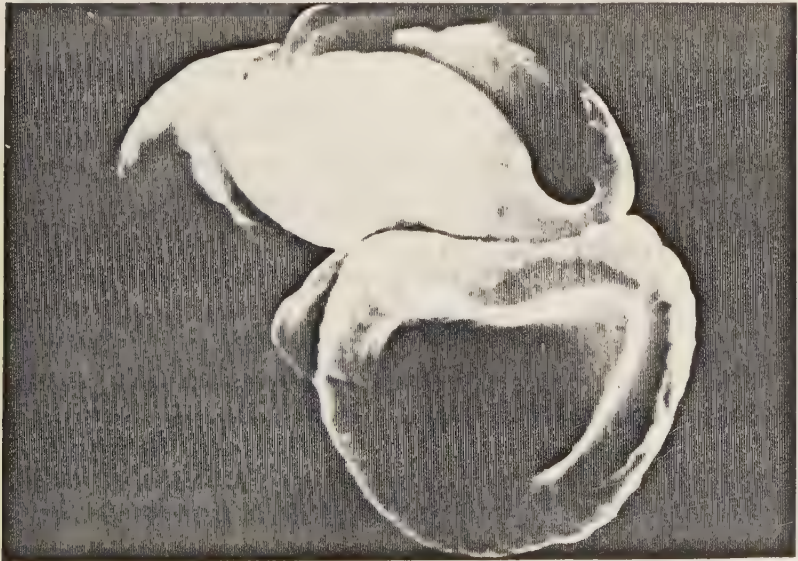


Abb. 24: Klumpen unförmig zusammengebackener Zellen mit zahlreichen Einstülpungen, Einziehungen und Löchern
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)



Abb. 25: Zerfetzte Zellmembranfragmente als schwerwiegendste Form von durch Ferrofluids hervorgerufenen morphologischen Veränderungen an Erythrozyten.
JEOL JSM-35 CF Scanning Microscope (20 kV; Vergrößerung: 10 000-fach)

2.3.3.3. Einflüsse verschiedener Parameter auf die morphologischen Veränderungen bei ferromagnetischen Trägererythrozyten

Den größten Einfluß auf das Ausmaß der morphologischen Veränderungen zeigten, ähnlich wie bei der Beladungsrate der Trägererythrozyten, wiederum die jeweils verwendeten Ferrofluids selbst. Präparationen aus den Vorversuchen mit anderen Ferrofluids als EMG 1111(BIO-I) lieferten so gut wie keine normalen bikonkaven Zellformen (< 5 %) und führten schon während der Beladung zu Hämolyseraten von 80 - 100 % der eingesetzten Zellen. Die verbliebenen Erythrozyten lagen zum größten Teil als große Zellaggregationen oder völlig unförmige Fragmente vor (> 60 %), die übrigen 30 % verteilten sich ziemlich gleichmäßig auf ein buntes Zellgemisch aus Sphärozyten, Echinozyten, Stomatozyten, vereinzelt Sichelzellen und andere pathologische Zellformen.

Wenn Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) zur Beladung von Erythrozytenschatten verwendet wurden, so waren sowohl das Ausmaß der morphologischen Veränderungen als auch die Hämolyserate während der Präparation vor allem von der Konzentration der Ferrofluids im Außenmedium abhängig. Bei Konzentrationen von 50 Vol% und mehr Ferrofluids im Dialyseschlauch betrugen die Zellverluste durch Hämolyse 80 - 100 %. Die nicht völlig zerstörten Zellen imponierten zu 2/3 als erheblich deformierte, verklumpte Zellhaufen und Membranfragmente und zu 1/3 als Sphärozyten, Stomatozyten, Echinozyten oder andere, weniger stark deformierte Zellformen. Nur ein verschwindend kleiner Rest konnte grobmorphologisch als bikonkave Erythrozyten bezeichnet werden (Tab. 14).

Mit abnehmender Konzentration der Ferrofluids im Außenmedium nahm die Anzahl der normal konfigurierten oder nur wenig alterierten Zellformen kontinuierlich zu, die Hämolyserate während der Beladung ging zurück (Tab. 14). Im übrigen zeigten Ferrofluids, die vorher mehrfach mit Aqua dest. gewaschen worden waren, ähnlich wie bei Bestimmung der Beladungsrate auch in morphologischer Hinsicht bessere Ergebnisse als unbehandelte Ferrofluids.

Tab. 14: Einfluß der Konzentration von Ferrofluids im Außenmedium auf die morphologischen Veränderungen bei Trägererythrozyten

Konzentration der Ferrofluids [Vol%]	50	25	12,5	6,25
bikonkave Zellen	< 5 %	10 - 20 %	20 - 30 %	20 - 30 %
mäßig alterierte Zellen (Sphärozyten, Echinozyten, Stomatozyten, Anulozyten)	35 %	35 - 50 %	50 - 65 %	60 - 80 %
stark alterierte oder völlig de- formierte Zellformen (Zellhaufen, Einstülpungen, Löcher, Membranfragmente)	> 60 %	30 - 45 %	10 - 20 %	< 10 %

Die übrigen Präparationsparameter (Art und Dauer der Ultraschallung der Ferrofluids, Hämatokrit, Temperatur, pH-Wert) übten keinen nachweisbaren Einfluß auf die Morphologie der Trägererythrozyten aus. Wie Sprandel et al. schon beschrieben haben, führten verlängerte Dialysezeiten und weniger schonendes Zentrifugieren während der Waschgänge zu einer verstärkten Alteration der Zellen ([66]).

Vergleicht man Tab. 14 mit Tab. 11 (S. 52), so erkennt man, daß mit abnehmender Ferrofluid - Konzentration im Dialyseschlauch die Zellen zwar erheblich weniger morphologisch alteriert werden, gleichzeitig aber auch die Beladungsrate für Ferrofluids sinkt. Die in Tab. 12 (S. 54) angegebene Standardpräparation für ferromagnetische Trägererythrozyten stellt somit einen Kompromiß zwischen möglichst hoher Beladungsrate und möglichst geringem Zellverlust sowie geringen morphologischen Veränderungen dar. Dennoch erhält man auch unter optimalen Bedingungen nur etwa 10% der ursprünglich eingesetzten Zellen als normal konfigurierte bikonkave Trägererythrozyten, die einerseits ausreichend mit Ferrofluids beladen sind, um sich durch Magnetfelder beeinflussen zu lassen, und andererseits aufgrund ihrer geringen morphologischen Veränderungen die Wahrscheinlichkeit einer gewissen Überlebenszeit im Organismus in sich bergen. Ob diese elektronenmikroskopisch "normalen" Zellen eventuell nicht erfaßbare Membrandefekte aufweisen, die zu einem rascheren Zelluntergang oder starken Leckströmen aus den beladenen Erythrozytenschatten führen, sollte ein zweiter großer Versuchskomplex klären.

3. VERLUST DER FERROMAGNETISCHEN EIGENSCHAFTEN VON TRÄGERERYTHROZYTE NACH ABSCHLUSS DES PRÄPARATIONSVORGANGS

3.1. MATERIALIEN

Alle verwendeten Materialien (Erythrozyten; Chemikalien; Ferrofluids) und Geräte wurden bereits in Kapitel 2.1. ausführlich beschrieben. Zusätzlich kamen zur Anwendung:

- 0,08 %ige Glutardialdehydlösung (0,10 ml 25 %iger Glutardialdehyd auf 31,25 ml Puffer I)
- Furosemid (z.B. Lasix)

3.2. METHODEN

3.2.1. Versuchsanordnung zur qualitativen und quantitativen Ermittlung der Verlustrate an Ferrofluids aus Trägererythrozyten

Die zum Teil ganz erheblichen Veränderungen der Erythrozytenmembranen, die im Rasterelektronenmikroskop zu beobachten waren, legten den Gedanken nahe, daß die Zellen im Laufe der Zeit die in ihnen eingeschlossenen Ferrofluids über Membrandefekte wieder verlieren könnten und damit nicht mehr durch äußere Magnetfelder beeinflussbar wären. Auch im Hinblick auf die mögliche spätere klinische Anwendung von ferromagnetischen Trägererythrozyten war es deshalb wichtig, sich über das weitere Schicksal dieser Zellen nach ihrer Beladung mit Magnetitpartikeln Klarheit zu verschaffen.

Es sind prinzipiell mehrere verschiedene Wege denkbar, auf denen ein Verlust von Ferrofluids aus den damit beladenen Zellen stattfinden könnte: zum einen könnten die Magnetitpartikel über eine Art Leckstrom entlang des Konzentrationsgradienten durch die alterierte oder auch intakte Erythrozytenmembran wieder nach außen gelangen, ohne daß die Trägerzelle selbst zugrundegehen müßte. Zum anderen könnten aber auch die beladenen

Zellen durch die zytotoxische Aktivität der Ferrofluids rasch zerstört werden, und die Magnetitpartikel würden einfach durch Hämolysen ihrer Trägerzellen wieder freigesetzt werden. Schließlich darf auch ein Verlust von Ferrofluids über aktive Transportmechanismen der Zellmembran (K^+ - Na^+ -Pumpe oder andere Carriersysteme) nicht außer acht gelassen werden. Eine weitere Möglichkeit, nämlich eine Inaktivierung ("Entmagnetisierung") der Ferrofluids durch Inhaltsstoffe des Erythrozyten, konnte bereits durch Vorversuche ausgeschlossen werden (vgl. hierzu Abschnitt 2.3.1.5.).

Eine Versuchsanordnung, welche die Verlustrate an Ferrofluids aus den Trägererythrozyten qualitativ und quantitativ erfassen sollte, mußte all diese Möglichkeiten berücksichtigen. Deswegen wurden fünf verschiedene Zellgruppen gebildet, welche über einen größeren Zeitraum simultan beobachtet wurden:

a) Trägererythrozyten (TE):

Gewaschene Erythrozyten wurden der Standardpräparation für Trägererythrozyten unterzogen.

Auf diese Weise wurden ferromagnetische Trägererythrozyten gewonnen, an denen die Kinetik des Ferrofluid-Efflux studiert werden konnte.

b) Kontrollzellen 1 (K_1):

Gewaschene Erythrozyten wurden entsprechend den Vorschriften der Standardpräparation gegen ein Gemisch aus isoosmolarem Puffer und Ferrofluids dialysiert. Diese Zellen waren also genauso lange wie die Trägererythrozyten, aber nur von außen her den Ferrofluids ausgesetzt, so daß kein Einschluß von Magnetitpartikeln stattfand, weil die Zellen im isoosmolaren Milieu nicht eröffnet wurden.

Die Meßergebnisse dieser Zellen erlaubten, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, zunächst eine Aussage über die Restverunreinigung der Trägererythrozyten und damit die Bestimmung der wahren Beladungsrate. Darüber hinaus konnte das Ausmaß des Zelluntergangs und des Hämoglobinefflux im Vergleich mit den Trägererythrozyten ermittelt werden.

c) Kontrollzellen 2 (K_2):

Gewaschene Erythrozyten wurden entsprechend den Vorschriften der Standardpräparation gegen hypoosmolaren Puffer dialysiert (sie wurden also eröffnet), dem Dialyseschlauch waren aber keine Ferrofluids zugegeben. Die Zellen kamen demnach nie mit Ferrofluids

in Berührung, durchliefen aber ansonsten die gesamte Dialyseprozedur.

Diese Zellgruppe erlaubte eine Abschätzung der Hämoglobinverluste der Erythrozyten während der Dialyse. Außerdem konnte aufgrund der Ergebnisse der K₂-Zellen eine Aussage über den Anteil der Membranschäden gemacht werden, die nicht durch die Ferrofluids, sondern allein schon durch die Dialyseprozedur zustande kamen.

d) Glutardialdehyd-Zellen (GDA):

Gewaschene Erythrozyten wurden entsprechend den Vorschriften der Standardpräparation mit Ferrofluids beladen (wie die TE-Zellen). Nach dem letzten Waschgang wurden die Zellen dann für 5 Minuten bei 20 °C in 0,08 %iger Glutardialdehydlösung inkubiert. Durch diese Behandlung wird die Zellmembran der Erythrozyten fixiert und es sind keine weiteren Membranveränderungen und kein Efflux von Makromolekülen (z.B. Hämoglobin) mehr möglich. Die Zellfixierung mit Glutardialdehyd wurde von Lieber & Steck ([41]), Baker ([4], S. 1797 ff.) und DeLoach ([14]) bereits beschrieben und durchgeführt.

Die Meßergebnisse dieser Zellgruppe sollten zeigen, ob sich ein Efflux von Ferrofluids durch Membranfixierung hemmen oder wenigstens verringern läßt. Außerdem ermöglichten die GDA-Zellen eine Differenzierung der Ferrofluid-Verluste in Leckströme oder Zellhämolyse.

e) Furosemid-Zellen (F):

Gewaschene Erythrozyten wurden entsprechend den Vorschriften der Standardpräparation mit Ferrofluids beladen (wie die TE-Zellen). Danach wurde der Zellsuspension Furosemid (4 mg/2 ml Zellsuspension) zugesetzt.

Da Furosemid die Membrantransportsysteme (K⁺-Na⁺-Pumpe u.a.) zu blockieren vermag, konnte anhand der Meßergebnisse dieser Zellgruppe ein möglicher Efflux von Ferrofluids über solche Membrantransportsysteme studiert werden.

Jede der fünf Zellgruppen wurde auf mehrere Probenröhrchen aufgeteilt (jeweils 0,6 ml Zellen pro Röhrchen). Die Röhrchen der Zellgruppen TE, K₁, K₂ und GDA wurden mit 1,4 ml Puffer I* auf 2,0 ml, die Röhrchen der Zellgruppe F mit 1,0 ml Puffer I* und 0,4 ml (= 4 mg) Furosemid ebenfalls auf 2,0 ml aufgefüllt und anschließend alle Röhrchen bis zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bei + 4° C unter ständiger Rotation aufbewahrt. Durch die Lagerung bei + 4° C wurde der Stoffwechsel der Zellen auf ein Minimum herabgesetzt; Puffer I* enthält Glucose, MgCl₂ und Adenosin und diente als Energielieferant für die Erythrozyten.

Jeweils nach 45 Minuten, 90 Minuten, 135 Minuten, 210 Minuten und nach 18 Stunden wurden Proben von allen fünf Zellgruppen folgendermaßen analysiert:

- a) Aus dem gut geschüttelten Probenröhrchen wurde zunächst mit dem Coulter-Counter die Zahl der zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebenen, nicht durch Hämolyse zugrundegegangenen Zellen (Zellen/ml) bestimmt.
- b) Danach wurden die während der Lagerung freigesetzten Ferrofluids mit einem starken Magneten aus der Zellsuspension abgezogen. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein Reagenzglas überführt und für 15 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit 530 g zentrifugiert.
- c) Aus 0,2 ml des Überstandes wurde das zum jeweiligen Zeitpunkt aus den Zellen freigesetzte Hämoglobin bestimmt.
- d) 0,5 ml des Sediments (= Zellen) wurden zur Bestimmung der zum jeweiligen Zeitpunkt verbliebenen Restsuszeptibilität der Zellen verwendet.

Aus der Zellzahl und der Bestimmung des Hämoglobins konnte dann auf den Umfang des Zellunterganges geschlossen werden, die Restsuszeptibilität der Zellen gab Auskunft über das Ausmaß und den zeitlichen Ablauf des Ferrofluid-Efflux.

3.2.2. Beschreibung der verwendeten Hilfsmethoden

3.2.2.1. Zellzählung

Die Zellzählung sowie die dazu nötige Vorverdünnung der Zellsuspension wurde vollautomatisch mit einem Coulter-Counter MS 30 durchgeführt und ausgewertet.

3.2.2.2. Hämoglobinbestimmung

Zur Hämoglobinbestimmung diente das Testsystem "Hämoglobin" der Firma Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica (Bestell-Nr. 124729). Die nötigen Chemikalien wurden entsprechend den Richtlinien des Herstellers verwendet.

Zunächst wurden 0,2 ml des Inhalts eines Probenröhrchens untersucht und die gemessene Extinktion einem Hämoglobingehalt von 100 % gleichgesetzt. Diese Extinktion entspricht einer totalen Hämolyse aller Zellen im Probenröhrchen.

Wie oben dargestellt wurden dann zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten jeweils 0,2 ml des Überstandes (nach Zentrifugieren) eines Probenröhrchens auf den Hämoglobingehalt untersucht und die gemessenen Extinktionswerte prozentual auf die vorher bestimmte Gesamtmenge des Hämoglobins in der Zellsuspension bezogen. Da man davon ausgehen kann, daß alle Zellen in etwa gleichviel Hämoglobin enthalten, war es möglich, von der Hämoglobinbestimmung (z.B. Überstand enthält 14 % der Gesamtmenge des Hämoglobins) auf das Ausmaß der Hämoglobinfreisetzung aus den Trägererythrozyten und, unter Berücksichtigung der Zellzahlen, auch auf die Größe des Zelluntergangs zu schließen.

Beispiel: Bestimmung der Extinktion aus 0,2 ml Hämolysat eines Probenröhrchens nach totaler Hämolyse $\hat{=}$ Zelluntergang von 100 % :

$$E = 1,435$$

Bestimmung der Extinktion aus 0,2 ml des Überstandes eines Probenröhrchens nach 3,5 Std. Lagerung:

$$E = 0,115 \hat{=}$$
 Zelluntergang von 8 %

3.2.2.3. Suszeptibilitätsmessungen

Die Messungen wurden nach den im Kapitel 2.2.2. angegebenen Richtlinien durchgeführt und ausgewertet.

3.3. ERGEBNISSE

Die Meßergebnisse sind in Tab. 15 wiedergegeben und für den interessanten Zeitraum von 0 bis 4 Stunden in den Abb. 26 - 28 graphisch dargestellt.

Tab. 15: Meßergebnisse aus dem Versuch zur Bestimmung des Ferrofluid-Efflux aus Trägererythrozyten

Art der Probe und Untersuchungszeitpunkt	Zellzahl [10 ⁶ Zellen/μl]	Extinktionswert für die Hb-Bestimmung	Suszeptibilität χ ₅ μV	
Ferrofluid-Puffer-Mischung (= 100 % der angebotenen Ferrofluidmenge)	—	—	(9,98 200 μV) = 399,2 5 μV	
TE 0 min	3,26	0,023	100 % Hämo- lyse ent - sprechen einer Ex- tinktion: <u>E = 1,435</u>	7,52
TE 45 min	3,30	0,041		1,34
TE 90 min	3,05	0,080		0,70
TE 135 min	3,02	0,101		0,32
TE 210 min	2,94	0,115		0,30
TE 18 h	3,23	0,238		0,30
K ₁ 0 min	2,79	0,003	100 % Hämo- lyse ent - sprechen einer Ex- tinktion: <u>E = 2,026</u>	1,41
K ₁ 45 min	2,68	0,004		0,33
K ₁ 90 min	2,46	0,005		0,20
K ₁ 135 min	2,30	0,007		0,17
K ₁ 210 min	2,25	0,009		0,17
K ₁ 18 h	2,82	0,012		0,17
K ₂ 0 min	2,91	0,019	100 % Hämo- lyse ent - sprechen einer Ex- tinktion: <u>E = 1,600</u>	entfällt, da K ₂ -Zellen nie mit Ferrofluids in Berührung kamen.
K ₂ 45 min	2,97	0,032		
K ₂ 90 min	2,79	0,066		
K ₂ 135 min	3,00	0,070		
K ₂ 210 min	2,60	0,078		
K ₂ 18 h	2,97	0,166		

Tab. 15 (Fortsetzung)

Art der Probe und Untersuchungszeitpunkt	Zellzahl [10 ⁶ Zellen/μl]	Extinktionswert für die Hb-Bestimmung	Suszeptibilität χ _{5 μV}
GDA 0 min	0,81	0,033	3,68
GDA 45 min	0,79	0,039	0,60
GDA 90 min	0,83	0,045	0,24
GDA 135 min	0,79	0,048	(0,90) ⚡ Meßfehler
GDA 210 min	0,80	0,048	0,60
GDA 18 h	0,82	0,077	0,40
F 0 min	3,26	0,023	7,48
F 45 min	3,34	0,041	0,23
F 90 min	3,30	0,066	0,23
F 135 min	3,02	0,074	0,22
F 210 min	2,81	0,090	0,34
F 18 h	3,27	0,417	0,23

Meßgenauigkeit für Zellzahl: $\pm 0,05$

Meßgenauigkeit für Extinktion: $\pm 0,05$

Meßgenauigkeit für Suszeptibilität: $\pm 0,03$

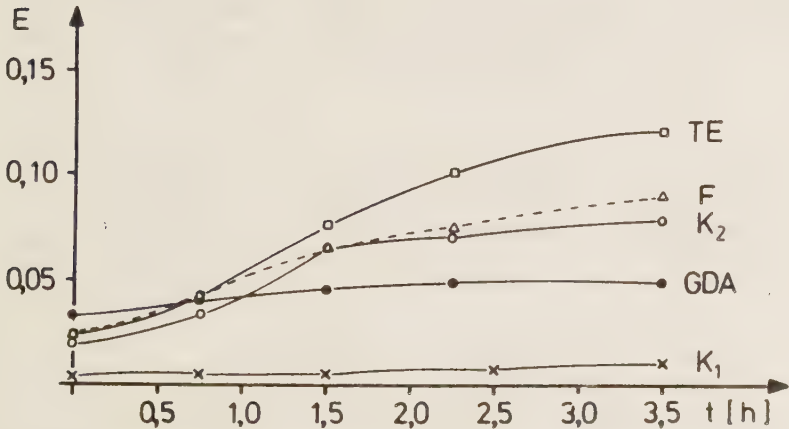


Abb. 26: Zunahme des freien Hämoglobin in der Zellsuspension der Proben

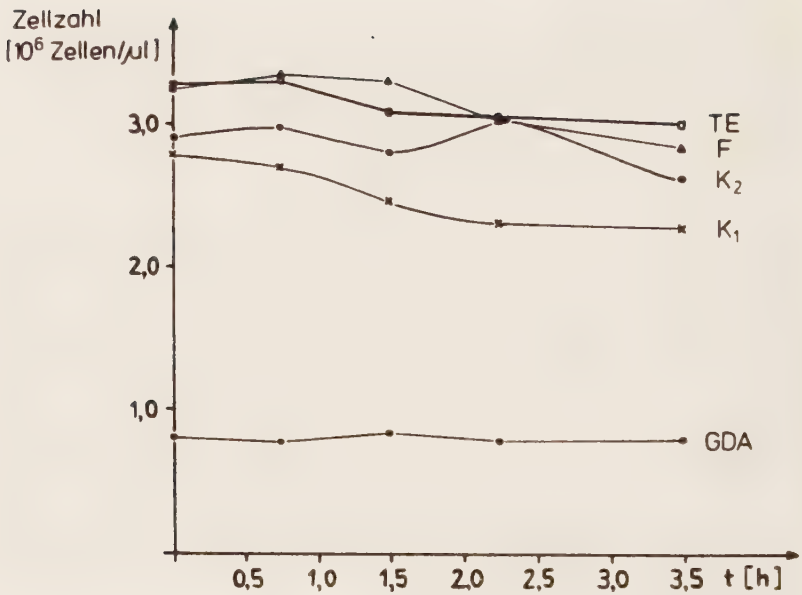


Abb. 27: Zellzahl der nicht hämolysierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Da der Coulter-Counter teilweise auch größere zerstörte Zellmembranfragmente mit erfaßt, sind die Zellzahlen nur ein grober Anhaltspunkt für das Ausmaß der Hämolysen und können nur in Zusammenhang mit der Zunahme des freien Hämoglobins (Abb. 26) interpretiert werden (Einzelheiten im Text!)

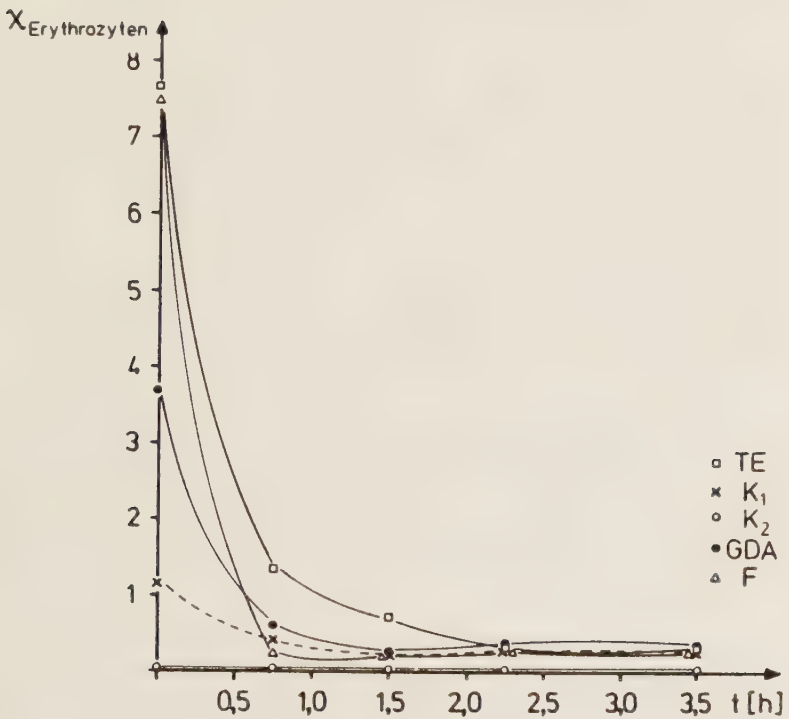


Abb. 28: Efflux der Ferrofluids aus den 5 verschiedenen Zellgruppen. Eingezeichnet sind die zu den verschiedenen Zeitpunkten verbliebenen Restsuszeptibilitäten der Zellen ($\chi_{\text{Erythrozyten}}$). Die anfängliche Suszeptibilität (Zeitpunkt t_0) der Trägererythrozyten entspricht in dieser Versuchsreihe einer Beladungsrate von 6,2 %.

Bei der Auswertung und Interpretation der oben wiedergegebenen Meßdaten kommt man zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Beladungsrate in dieser Versuchsreihe betrug 6,2 % der angebotenen Ferrofluids nach Korrektur um die Leerwertverunreinigung von gut 1,3 % (K_1 -Zellen); das heißt es wurde eine im Gesamtspektrum der mit verschiedenen Ferrofluids möglichen Ergebnisse (3% - 15%) mittlere Beladungsrate erzielt, so daß die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe auch repräsentativ für höhere und geringere Beladungsraten sein dürften. Selbstverständlich wurde diese Versuchsreihe mehrfach und mit verschiedenen Ferrofluid-Lieferungen durchgeführt, was zu zahlenmäßig geringfügig anderen Ergebnissen führte (vgl. Tab. 17 und Abb. 29, S. 76/77). Die Grundtendenz all dieser Versuchsreihen ist jedoch inhaltlich die gleiche.

2. Wie erwartet zeigten die K_1 -Zellen einen hohen Hämoglobingehalt pro Zellvolumen (Tab. 16) und die niedrigste Hämoglobinkonzentration im Überstand bei der Nullbestimmung (Tab. 15, Hb-Bestimmung zum Zeitpunkt t_0). Diese Zellen waren gegen isoosmolaren Puffer dialysiert und also nicht eröffnet worden, so daß während der Präparation fast kein Hämoglobin aus dem Zellinneren herausdiffundieren hatte können.

Bei den Zellgruppen TE, K_2 und F hingegen lag der Hämoglobingehalt der Zellen erheblich niedriger (Tab. 16), und die Hämoglobinkonzentration im Überstand bei der Nullbestimmung war wesentlich größer (Tab. 15, Hb-Bestimmung zum Zeitpunkt t_0) als bei den K_1 -Zellen. Hier hatte eine Dialyse gegen hypoosmolaren Puffer stattgefunden, was die Hämoglobinverluste während der Präparation erklärt.

Lediglich die ebenfalls gegen hypoosmolaren Puffer dialysierten GDA-Zellen zeigten hinsichtlich des Parameters "Hämoglobin" Unterschiede: Sie waren vor dem letzten Waschgang mit Glutardialdehyd fixiert worden, so daß kein Hämoglobin mehr hatte ausgewaschen werden können und folgerichtig ein höherer Hämoglobingehalt der Zellen resultierte (Tab. 16). Andererseits klumpten die Zellen nach der Behandlung mit Glutardialdehyd leichter zusammen, so daß dem Überstand nicht mehr soviel Hämoglobin entzogen werden konnte, was die höhere Nullwert-Konzentration an Hämoglobin erklärt (Tab. 15, Hb-Bestimmung zum Zeitpunkt t_0). Schließlich wurde durch zusammengeklumpte Zellen auch der Coulter-Counter irritiert, so daß er leicht etwas

Tab. 16: Hämoglobingehalt der fünf verschiedenen Zellgruppen ($E/10^6$ Zellen).
Die Tabellenwerte errechnen sich aus den Extinktionswerten für 100 % Hämolyse und den gemessenen Zellzahlen/ μ l der Tab. 15.

Zellgruppe	TE	K_1	K_2	GDA	F
Hämoglobingehalt [$E/10^6$ Zellen]	$2,17 \cdot 10^{-3}$	$3,60 \cdot 10^{-3}$	$2,70 \cdot 10^{-3}$	$11,40 \cdot 10^{-3}$	$2,17 \cdot 10^{-3}$

zu niedrige Zellzahlen zählte (Tab. 15, Zellzahl der GDA-Zellen), was wiederum einen Einfluß auf den errechneten Hämoglobingehalt der Zellen hatte.

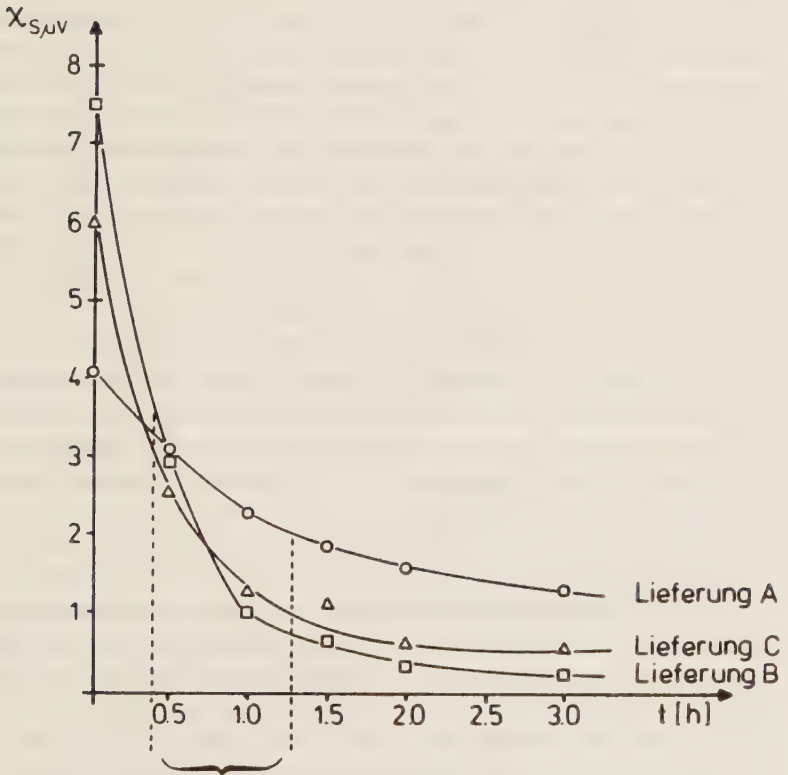
Diese meßtechnisch nicht vermeidbaren Diskrepanzen der Ausgangswerte sind also aus der Versuchsanordnung erklärlich. Bei Betrachtung des Verlaufes über mehrere Stunden sind sie nicht so schwerwiegend, weil man die zeitlichen Veränderungen von Hämoglobinkonzentration, Zellzahl und Suszeptibilität ohne weiteres für die einzelnen Zellgruppen getrennt betrachten und prozentual zu den jeweiligen Ausgangswerten in Beziehung setzen, sie aber danach unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausgangswerte der Einzelpopulationen doch gut miteinander vergleichen kann.

3. Betrachtet man die Ausgangswerte der Suszeptibilität pro Zellvolumen bei den drei beladenen Zellgruppen (TE, GDA, F), so stimmen TE- und F-Zellen mit einer Suszeptibilität von $2,27/10^6 \text{ Zellen}_{\text{TE}}$ bzw. von $2,26/10^6 \text{ Zellen}_{\text{F}}$ gut überein (sie wurden ja auch nach der gleichen Methode behandelt). Die GDA-Zellen weisen mit $4,54/10^6 \text{ Zellen}_{\text{GDA}}$ eine wesentlich höhere errechnete Ausgangssuszeptibilität auf. Man darf daraus jedoch nicht auf eine höhere Beladungsrate dieser Zellen schließen; denn wie schon erwähnt neigen die GDA-Zellen zur Verklumpung, so daß fälschlicherweise zu niedrige Zellzahlen und eine stark erhöhte Restverunreinigung resultieren (zwischen verklumpten Zellen halten sich Ferrofluid-Rückstände besonders gut an der Außenseite der Zellmembranen und können nur schwer eliminiert werden). Für die Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der Ferrofluid-Verluste ist dies aber, wie oben schon dargelegt, ziemlich unerheblich, weil bei allen GDA-Zellen mit den gleichen Ausgangsbedingungen zu rechnen ist.

Tab. 17: Verlustrate aus mit verschiedenen Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten, aufgezeigt am zeitlichen Verlauf der zu entsprechenden Untersuchungszeitpunkten meßbaren Restsuszeptibilitäten der Zellen $\chi_{5 \mu V}$ (vgl. auch letzte Spalte von Tab. 15).

Verwendete Ferrofluids	Ferrofluids aus Lieferung A	Ferrofluids aus Lieferung B	Ferrofluids aus Lieferung C
Suszeptibilität $\chi_{5 \mu V}$ der zur Beladung eingesetzten Ferrofluid-Puffer-Mischung (= 100 % der angebotenen Ferrofluid-Menge)	579,20	399,20	140,50
Suszeptibilität der Träger- erythrozyten zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt:			
0 min ($\chi_{5 \mu V}$)	4,10	7,52	6,00
30 min ($\chi_{5 \mu V}$)	3,10	2,95	2,57
60 min ($\chi_{5 \mu V}$)	2,30	1,05	1,30
90 min ($\chi_{5 \mu V}$)	1,90	0,70	1,13
120 min ($\chi_{5 \mu V}$)	1,60	0,40	0,60
180 min ($\chi_{5 \mu V}$)	1,35	0,32	0,60
Suszeptibilität der Kontroll- zellen (= Restverunreinigung) [$\chi_{5 \mu V}$]	0,70	1,41	1,80
erzielte Beladungsrate [%]	2,4 %	6,2 %	12,5 %
Zeitpunkt, zu dem noch 50 % der Ausgangssuszeptibilität der Zellen nachweisbar sind	78 min	24 min	27 min

Meßgenauigkeit: $\pm 0,05$



Zeitraum, nach dem bei den verschiedenen Trägererythrozyten noch 50 % der Ausgangssuszeptibilität nachweisbar sind (Tab. 17)

Abb. 29: Zeitlicher Verlauf des Ferrofluid-Efflux bei mit verschiedenen Ferrofluids beladenen Trägererythrozyten. Eingezeichnet sind die zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten verbliebenen Restsuszeptibilitäten der Zellen ($\chi_{5\mu V}$).

4. Wie bereits aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (vgl. Kapitel 2.3.) zu befürchten war, setzte bei den beladenen Zellen rasch ein ganz erheblicher Verlust der magnetischen Suszeptibilität ein. Bereits nach knapp einer halben Stunde betrug die aktuelle Restsuszeptibilität der Trägererythrozyten nur noch die Hälfte der Ausgangssuszeptibilität (Abb. 28); nach gut einer Stunde war sogar nur noch ein Zehntel (!) der Ausgangssuszeptibilität meßbar (Abb. 28), ein Wert, der sich schon stark dem Bereich der Restverunreinigung unbeladener Zellen annähert. Es muß also davon ausgegangen werden, daß ferromagnetische Trägererythrozyten nach einer bis maximal eineinhalb Stunden ihre magnetischen Eigenschaften praktisch vollständig wieder verloren haben.

Die Versuchsreihe wurde, wie schon erwähnt, auch mit Ferrofluids aus anderen Lieferungen durchgeführt. Wie aus Tab. 17 und Abb. 29 hervorgeht, lagen die zeitlichen Grenzwerte für den Ferrofluid-Efflux hier teilweise etwas höher. Im großen und ganzen bestätigte sich aber der rasche Verlust der eingeschlossenen Magnetitpartikel aus den beladenen Trägererythrozyten in allen Experimenten dieser Art.

5. Der beobachtete rasche Ferrofluid-Efflux aus den Trägererythrozyten wird sicher durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren hervorgerufen. Dabei dürfte aber "Leckströmen" durch "Löcher" in den alterierten Erythrozytenmembranen, die während der Präparation durch den Kontakt mit den toxischen Substanzen der Ferrofluids entstanden sind, die Hauptrolle zufallen. Dies läßt sich anhand der Ergebnisse aus den fünf verschiedenen Zellgruppen folgendermaßen belegen:

Die Verlustrate war für alle Zellgruppen ungefähr identisch (Abb. 28). Aktive Transportmechanismen in der Zellmembran als Ursache für die Ferrofluid-Verluste scheiden damit weitgehend aus. Wären solche "Membran-Carrier" am Transport der Magnetitpartikel aus den Zellen maßgeblich beteiligt, dann müßten die Verluste aus den F-Zellen, deren Transportsysteme durch Furosemid blockiert worden waren, wesentlich geringer sein, als bei den übrigen Zellen. Tatsächlich waren sie aber eher noch etwas größer (Abb. 28).

Die Leckströme der Ferrofluids ließen sich auch durch Fixierung der Erythrozytenmembran mit Glutardialdehyd nicht ver-

hindern. Diese Tatsache spricht dafür, daß die Ferrofluids nicht einfach durch den Zerfall der mit ihnen beladenen Zellen wieder freigesetzt wurden; denn die GDA-Zellen können nach ihrer Fixierung nicht mehr zerfallen. Trotzdem aber nahm ihre Suszeptibilität im gleichen Maß ab, wie bei den übrigen Zellgruppen. Dieser zunächst etwas erstaunende Befund läßt sich erklären, wenn man bedenkt, daß die während des Kontakts mit den Ferrofluids entstandenen Membrandefekte durch Glutardialdehyd ebenfalls "mitfixiert" werden, wie Baker ([4], S. 1797 ff.) zeigen konnte. Diese Defekte sind zwar zu klein, als daß das große Hämoglobin-Molekül ungehindert aus den Zellen herausdiffundieren könnte. Darauf weist die bei den GDA-Zellen im Vergleich zu den übrigen Zellgruppen erheblich geringere Zunahme an freiem Hämoglobin im Überstand während der Lagerung hin (Tab. 15 und Abb. 26).*) Ferrofluid-Moleküle sind aber wesentlich kleiner als das Hämoglobin, so daß sie durch die nun zusätzlich fixierten Läsionen der Zellmembran die GDA-Zellen sogar etwas rascher als die nicht fixierten Zellen wieder verlassen konnten (Tab. 15 und Abb. 28, GDA-Zellen).

Auch die Ergebnisse der Bestimmungen von Hämoglobinkonzentration im Überstand und Zellzahl und ihr zeitlicher Verlauf untermauern die Annahme, daß die Ferrofluids durch "Leckströme" und nicht durch Zelluntergang freigesetzt wurden: Bereits nach spätestens 1,5 Stunden hatten die Trägererythrozyten ihre magnetischen Eigenschaften fast vollständig verloren, das heißt man kann davon ausgehen, daß nach einem Zeitraum von 3,5 Stunden nahezu alle Magnetitpartikel aus den Zellen verschwunden sind (= vorletzter Untersuchungszeitpunkt bei der vorliegenden Versuchsreihe, vgl. Tab. 15). Wären die Ferrofluids nur oder zumindest überwiegend durch den Untergang ihrer Trägerzellen freigesetzt worden, müßte man erwarten, daß nach 3,5 Stunden die Mehrzahl der Zellen zerstört seien; man müßte also im Überstand Konzentrationen freien Hämoglobins nachweisen können, die einem Untergang von mindestens 60 - 80 % der Zellen entsprächen. Ebenso müßte die Zellzahl, die mit dem Coulter-Counter ermittelt wurde, deutlich reduziert sein.

Tatsächlich aber war nach 3,5 Stunden nur eine Hämoglobinmenge freigesetzt worden, die bei den Trägererythrozyten (TE) einem maximalen Zelluntergang von 8 % entsprach, wenn man, wie im Abschnitt 3.2.2.2. erläutert,

*) Gleichzeitig ist die geringe Hämoglobinfreisetzung während der Lagerung ein Nachweis für die Effektivität der Erythrozyten-Fixierung mit Glutardialdehyd (die Zellen können nicht mehr zerfallen).

die freigesetzte Hämoglobinmenge bei totaler Hämolyse des Inhalts eines Probenröhrchens als 100 % Zelluntergang annimmt. Wie Tab. 18 zeigt, waren die Hämoglobinemengen, die aus den anderen Zellgruppen freigesetzt wurden, sogar noch geringer.

Auch die mit dem Coulter-Counter ermittelte geringe Abnahme der Zellzahlen (Tab. 15 und Abb. 27) untermauert das Ergebnis der Hämoglobinbestimmung im Überstand. Zwar sind die Zellzahlen wegen der zahlreichen Artefakte - der Coulter-Counter zählt fälschlicherweise auch größere Membranfragmente als "Zellen" mit - nicht so aussagekräftig, aber bei Zellverlusten in der Größenordnung von 60 - 80 % hätte man mit Sicherheit auch hier andere Resultate bekommen.

Alle Befunde der vorliegenden Versuchsreihe sprechen also eindeutig für das Vorliegen von "Leckströmen" über die alterierte Zellmembran als Ursache für den raschen Ferrofluid-Efflux aus ferromagnetischen Trägererythrozyten.

Tab. 18: Freigesetzte Hämoglobinmenge im Überstand und entsprechendes Ausmaß des Zelluntergangs bei den fünf verschiedenen Zellgruppen nach einem Zeitraum von 3,5 Stunden (errechnet aus den Meßwerten der Tab. 15)

Zellgruppe	TE	K ₁	K ₂	GDA	F
Extinktionswert für die Hb-Bestimmung	0,115	0,009	0,078	0,048	0,090
Zelluntergang [in % der Ausgangszellzahlen]	8,0 %	0,6 %	4,8 %	2,6 %	6,2 %

4. BEEINFLUSSBARKEIT FERROMAGNETISCHER TRÄGERERYTHROZYTEN MITTELS STARKER ÄUSSERER MAGNETFELDER IM IN-VITRO- KREISLAUFMODELL

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über mit Ferrofluids beladene Trägererythrozyten ließen vermuten, daß solche Zellen sich im Bereich starker Magnetfelder wegen der großen Leckströme und dem damit verbundenen raschen Suszeptibilitätsverlust nur in den ersten Minuten nach der Präparation beeinflussen lassen und später durch starke Magnetfelder höchstens beschleunigt entleert werden. Um diese Vermutung zu überprüfen und konkrete Aussagen über eventuelle Anreicherbarkeit von ferromagnetischen Trägererythrozyten machen zu können, wurden die Zellen in einem In-vitro-Kreislaufmodell getestet.

4.1. MATERIALIEN

Alle verwendeten Materialien (Erythrozyten; Chemikalien; Ferrofluids) und Geräte wurden bereits in Kapitel 2.1. ausführlich beschrieben.

Beim In-vitro-Kreislaufmodell kamen zusätzliche eine elektrische Rollenpumpe sowie Kunststoff- und Gummischläuche mit unterschiedlichen Durchmessern zur Anwendung.

4.2. METHODEN

4.2.1. Orientierender Vorversuch zur generellen Beeinflussbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder

Um sich vorab darüber zu informieren, ob ferromagnetische Trägererythrozyten sich durch ein äußeres Magnetfeld überhaupt beeinflussen lassen, wurden einige Tropfen einer definierten Trägererythrozytensuspension (Hämatokrit: 60 %) aus einer Pipette in ein mit Puffer I gefülltes Reagenzglas fallen gelassen, an dessen einer Seite ein starker Hufeisenmagnet (magnetische Flußdichte: 1200 Gauss) angebracht war.

4.2.2. Aufbau des In-vitro-Kreislaufmodells

Ziel des Modells war eine einfache, aber doch möglichst naturgetreue Simulation des Blutkreislaufs. Zu diesem Zweck wurde unter Modifikation eines von Akimoto et al. ([1], S. 50) vorgeschlagenen Modells ein Kreislaufsystem entwickelt, das aus einer Pumpe (= Herz), einem weitlumigen zuführenden (= V. cava) und einem eben solchen abführenden Schlauch (= Aorta) sowie diversen englumigeren Verzweigungen (= Kapillarsystem; vgl. Abb. 30) oder groß angelegten Senkbecken (= parenchymatöse Hohlorgane des Körpers; vgl. Abb. 31) bestand.

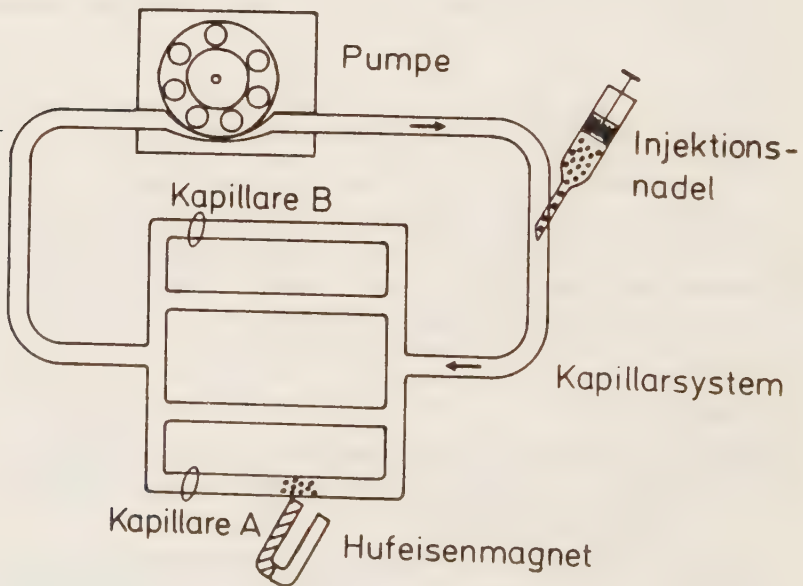


Abb. 30: In-vitro-Kreislaufmodell I: Imitation eines Kapillarnetzes

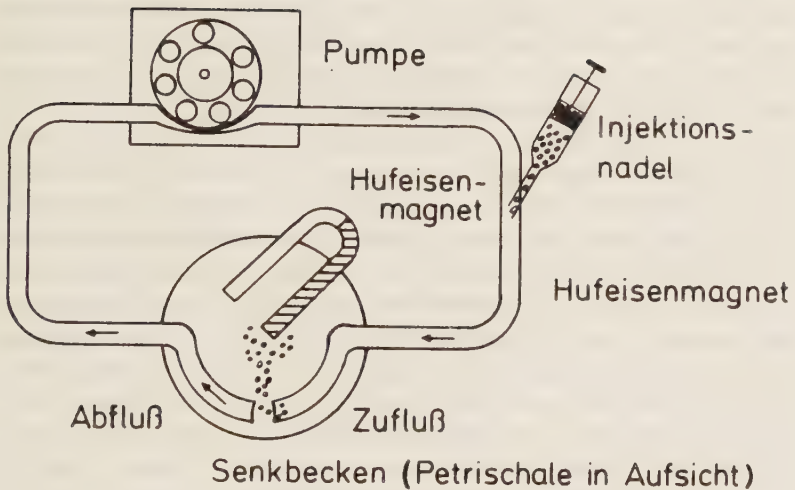


Abb. 31: In-vitro-Kreislaufmodell II: Imitation eines parenchymatösen Hohlorgans (z.B. Leber, Milz)

Die einzelnen Bestandteile des Kreislaufmodells sollen im folgenden noch ausführlicher erläutert werden:

Als Pumpe diente eine einfache Rollenpumpe, deren Pumpleistung sich in 10 verschiedenen Stufen verändern ließ, so daß für das Kreislaufmodell 10 verschiedene Fließgeschwindigkeiten einer jeweils laminaren Strömung in den Schlauchsystemen zur Verfügung standen (Tab. 19).

Tab. 19: Laufstufen der Rollenpumpe und jeweils damit korrelierende Fließgeschwindigkeiten in einem PVC-Schlauch, Innendurchmesser: 4 mm

Laufstufe der Rollenpumpe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fließgeschwindigkeit [mm/sec]	1,6	3,2	5,0	6,7	8,4	10,0	11,6	13,2	15,0	17,5

Die großen zu- und abführenden Schläuche bestanden aus PVC und hatten einen Innendurchmesser von 4,0 mm. Auch die Schlauchverzweigungen waren aus PVC hergestellt, besaßen jedoch nur einen Innendurchmesser von 2,5 mm. Kurz hinter jeder Verzweigungsstelle war ein Stück Gummischlauch mit 3,0 mm Innendurchmesser zwischen die großen und kleinen PVC-Schlauchabschnitte eingeschaltet, so daß jede einzelne Verzweigung zur Analyse der in ihr befindlichen Flüssigkeitssäule separat mit einer Injektionskanüle und einer Spritze entleert werden konnte.

Als Senkbecken diente eine gläserne Petrischale mit einem Zulauf und einem Abfluß aus PVC-Schlauch. Wie aus Abb. 31 ersichtlich, befand sich zwischen Zulauf und Abfluß eine Öffnung von 2,5 mm Breite, durch welche Ferrofluid-Partikel bzw. ferromagnetische Trägererythrozyten entsprechend dem "magnetischen Sog" des äußeren Magnetfeldes in die Petrischale entweichen konnten. Außer in dem Bereich der Petrischale, wo sich Zu- und Abfluß befanden, und wo die Fließgeschwindigkeit in etwa der des Schlauchsystems entsprach, näherten sich die Bedingungen im übrigen Teil des Senkbeckens einer stehenden Flüssigkeitssäule an, so daß magnetische Teilchen, die von dem dort angebrachten Hufeisenmagneten festgehalten wurden, nicht so einfach wieder fortgespült werden konnten. Damit wurden Fließbedingungen erreicht, die beispielsweise denen in großen Lebersinusoiden gleich kommen.

Bei der Wahl des äußeren Magnetfeldes und der Fließgeschwindigkeit im Kreislaufsystem orientierte ich mich an den von Ovadia et al. ([50], S. 633 ff.) angegebenen Hinweisen und Richtlinien. So hatte Ovadia zeigen können, daß es bei der Anreicherung ferromagnetischer Partikel an irgendeiner Stelle eines Kreislaufsystems mittels eines äußeren Magnetfeldes nicht so sehr auf die Stärke (Flußdichte) des Magnetfeldes ankomme, sondern vielmehr auf die Größe des Magnetfeldgradienten. Bei gleich großem Magnetfeldgradienten vermag ein Feld der Flußdichte von 4 000 Gauss beispielsweise nur 7,5 % mehr magnetische Partikel anzureichern als ein Feld von 2 000 Gauss, und dieses wiederum nur 9 % mehr als ein Feld von 1 000 Gauss ([50], S. 636). Oberhalb von 4 000 Gauss ist eine Mehranreicherung überhaupt nur noch durch eine erhebliche Steigerung des Magnetfeldgradienten zu erzielen. Aufgrund dieser Ergebnisse von Ovadia et al. erscheint der in der vorliegenden Arbeit verwendete Hufeisenmagnet (magnetische Flußdichte: 1200 Gauss; Magnetfeldgradient: 750 Gauss/cm) durchaus für die Versuche mit dem In-vitro-Kreislaufmodell geeignet.

Maximale Anreicherung von ferromagnetischen Mikrosphären in einem In-vitro-Kreislaufmodell fand Ovadia bei Fließgeschwindigkeiten im Bereich von 0,5 bis 2,0 mm/sec ([50], S. 636), was sich in etwa mit den Ergebnissen von Senyei und Widdler ([58]) deckt. Bei den Kreislaufversuchen in der vorliegenden Arbeit wurde die Pumpe deswegen für Kreislaufmodell I maximal mit Stufe 3 betrieben (vgl. Tab. 19), was unter Berücksichtigung der Zunahme des Gesamtquerschnittes des Schlauchsystems durch die zahlreichen Verzweigungen zu einer Fließgeschwindigkeit in dem oben angegebenen Bereich für das Kapillarnetz führte. Im Rahmen des Kreislaufmodells II wurde die Pumpe maximal mit Stufe 5 betrieben (vgl. Tab. 19), da in der Petrischale fast überall die Bedingungen einer stehenden Flüssigkeitssäule vorlagen.

Die weiterhin von Ovadia angegebenen Einflußfaktoren ([50]) auf die Größe der Anreicherung ferromagnetischer Partikel mittels eines äußeren Magnetfeldes beziehen sich fast ausschließlich auf In-vivo-Versuche an Tieren, so daß sie bei den vorliegenden In-vitro-Kreislaufmodellen unberücksichtigt bleiben konnten.

4.2.3. Versuchsablauf bei den beiden Kreislaufmodellen

Der Versuchsablauf war bei den beiden Kreislaufmodellen bis auf geringe Unterschiede im Bereich der Endstrombahn (Kapillarnetz bzw. Hohlorgan) ziemlich gleichartig.

Zunächst wurde jeweils das gesamte Kreislaufsystem mit Puffer I gefüllt. Anschließend wurde die Pumpe eingeschaltet. Während jeder Versuchsreihe wurde die Laufgeschwindigkeit der Pumpe konstant gehalten, nur bei verschiedenen Versuchsreihen wurde auch dieser Parameter variiert. In das durchflutete Kreislaufsystem wurde dann mit Hilfe einer Injektionsnadel (vgl. Abb. 30 und 31) ein Bolus von 1,0 ml des jeweils zu untersuchenden Mediums (Ferrofluids, Trägererythrozyten-Suspension, Kontrollzell-Suspension) innerhalb von 30 Sekunden im Schuß appliziert.

Nach unterschiedlich langen Laufzeiten (in der Regel bei hohen Laufgeschwindigkeiten 15 Minuten, bei niedrigen Laufgeschwindigkeiten 30 Minuten *),

*) längere Laufzeiten sind wegen der hohen Leckströme (vgl. Kapitel 3) sinnlos.

die stets so gewählt wurden, daß der Bolus das ganze Kreislaufsystem mehrfach durchlaufen hatte, wurde die Pumpe gestoppt und die jeweiligen Testareale (Kapillarnetz oder Senkbecken) vom Kreislaufsystem abgeklemmt und entleert. Die aus den Testarealen gewonnenen Flüssigkeitsvolumina wurden hinsichtlich ihrer Suszeptibilität und ihres Hämoglobingehaltes untersucht, wie in 4.2.4. noch ausführlich beschrieben wird. Bei jeder Versuchsreihe wurden jeweils Durchläufe mit und ohne Einfluß des Magnetfeldes durchgeführt und die Ergebnisse statistisch miteinander verglichen, um eine eventuelle signifikante Mehranreicherung von ferromagnetischen Partikeln im Bereich der dem Magnetfeld ausgesetzten Schläuche feststellen zu können. Dazu war es auch nötig, daß die dünnen Schlauchstücke nach den Verzweigungsstellen exakt die gleiche Länge hatten (20 cm); nur so konnten die einzelnen Meßwerte direkt miteinander verglichen werden.

An dieser Stelle sei auch erwähnt, daß vor Beginn der eigentlichen Messungen mittels eines Probedurchlaufs mit reinen Ferrofluids ohne jeglichen Einfluß äußerer Magnetfelder an irgendeiner Stelle des Schlauchsystems die gleichmäßige Durchströmung aller Schlauchverzweigungen überprüft wurde, um so spätere Artefakte, die allein aufgrund von vorneherein bestehender Durchströmungsunregelmäßigkeiten der einzelnen Schlauchabschnitte eine Mehranreicherung vortäuschen hätten können, weitestgehend auszuschließen.

4.2.4. Auswertung der Kreislaufversuche

Sollte es durch äußere Magnetfelder an einer Stelle des Kreislaufsystems zu einer Mehranreicherung von ferromagnetischen Trägererythrozyten kommen, so müßten diese Schlauchareale einen höheren Hämoglobingehalt (mehr Zellen!) und höhere Suszeptibilitätswerte aufweisen als Schlauchstücke, die keinen magnetischen Einflüssen ausgesetzt waren. Deswegen wurden die aus den Testarealen gewonnenen Flüssigkeitsvolumina folgendermaßen untersucht:

Zunächst wurde aus 0,1 ml der Suspension die Hämoglobinkonzentration bestimmt. Da man davon ausgehen kann, daß die gleiche Art von Zellen auch immer ungefähr gleiche Mengen an Hämoglobin enthält, genügt es, die jeweils gemessenen Extinktionswerte aus Testarealen (Schläuche, Senkbecken) mit und ohne Einfluß eines Magnetfeldes zu vergleichen, um eine Anreicherung von Zellen im Magnetfeld festzustellen. Die Extinktionswerte brauchen also vor-

her nicht erst in die absoluten Hämoglobin-Konzentrationen umgerechnet zu werden.

Anschließend wurden 0,5 ml des zu untersuchenden Flüssigkeitsvolumens aus den Testarealen in ein kleines Reagenzglas abgefüllt und daraus, wie schon erläutert, die Suszeptibilität bestimmt. Auch hier wurden die gemessenen Suszeptibilitäten aus Testarealen mit und ohne Einfluß eines Magnetfeldes verglichen.

4.3. ERGEBNISSE

4.3.1. Orientierender Vorversuch zur Beeinflußbarkeit von ferromagnetischen Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder

Läßt man Tropfen einer Trägererythrozyten-Suspension (Hämatokrit 60 %) aus einer Pipette in ein mit Puffer I gefülltes Reagenzglas fallen, dann sinken diese Tropfen, ohne ihre Fallrichtung zu ändern, langsam zu Boden. Wenn während dieses Experimentes ein starker Hufeisenmagnet in die Nähe des Reagenzglases gebracht wurde, so konnte man eine eindeutige Beeinflussung der Trägererythrozyten durch das Magnetfeld feststellen: die Tropfen änderten ihre Fallrichtung und wurden in die Nähe der Pole des Hufeisenmagneten abgelenkt (Abb. 32).

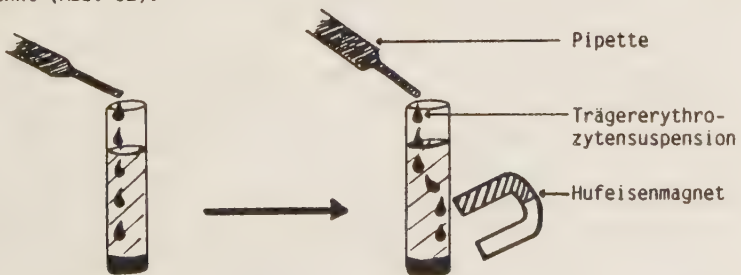


Abb. 32: Beeinflußbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten im Magnetfeld: Die Zellsuspensionstropfen ändern unter dem Einfluß eines Magnetfeldes ihre Fallrichtung und werden vom Magneten angezogen.

4.3.2. Probedurchlauf der Kreislaufmodelle I und II mit reinen Ferrofluids

Ferrofluids wurden mit Puffer I im Verhältnis 1:4 verdünnt. Anschließend erfolgte ein Probedurchlauf beider Kreislaufmodelle mit einem Bolus von jeweils 1,0 ml dieses Ferrofluid-Puffer-Gemisches (Pumpstufe 10; Laufzeit: 5 Minuten). Es wurden bei beiden Kreislaufmodellen Durchläufe mit und ohne Einfluß eines äußeren Magnetfeldes durchgeführt.

4.3.2.1. Kreislaufmodell I

Die beim Kreislaufmodell I erzielten Ergebnisse sind in Tab. 20 wiedergegeben.

Tab. 20: Gemessene Suszeptibilitäten beim Probedurchlauf von Kreislaufmodell I mit Ferrofluids

Testareal	Suszeptibilität $\chi_{50 \text{ uV}}$
Kapillare A <u>ohne</u> Magnetfeld	6, 10
Kapillare B <u>ohne</u> Magnetfeld	6, 30
Kapillare A <u>mit</u> Magnetfeld	1, 73
Kapillare B <u>ohne</u> Magnetfeld	9, 38

Kapillare A und B wurden jeweils gleichzeitig durchströmt; sie gehen aus einer Verzweigung des Kreislaufsystems hervor (vgl. Abb. 30) und haben exakt die gleiche Länge (20 cm). Wie das Meßergebnis zeigt, waren die beiden Kapillaren bei Fehlen jeglichen äußeren Magnetfeldeinflusses ziemlich gleichmäßig durchströmt, so daß Artefakte aufgrund einer von vorne herein unregelmäßigen Durchflutung des Kreislaufsystems vernachlässigbar klein sind. Wurde im Bereich von Kapillare A ein Hufeisenmagnet installiert, während Kapillare B weiterhin unbeeinflusst blieb, so durchströmten die Ferrofluids bevorzugt Kapillare A, wurden dort festgehalten und verstopften nach wenigen Sekunden die Kapillare A vollständig, so daß im weiteren Verlauf nur noch Kapillare B durchströmt werden konnte. Deswegen fand sich nach Beendigung des Durchlaufs in Kapillare B eine eindeutig höhere Suszeptibilität. Dieser Probedurchlauf bestätigte also die An-

nahme, daß das Kreislaufmodell I gleichmäßig durchströmt werde, und daß reine Ferrofluids sich im Kreislauf durch ein äußeres Magnetfeld an bestimmten Arealen anreichern lassen.

4.3.2.2. Kreislaufmodell II

Die beim Kreislaufmodell II erzielten Ergebnisse sind in Tab. 21 wiedergegeben.

Tab. 21: Gemessene Suszeptibilität im Senkbecken beim Probedurchlauf mit und ohne Einfluß eines äußeren Magnetfeldes (reine Ferrofluids)

Durchlauf ohne Einfluß eines äußeren Magnetfeldes	$\chi_{50 \mu V} = 3,78$
Durchlauf mit Einfluß eines äußeren Magnetfeldes	$\chi_{50 \mu V} = 10,55$

Wie aus den Meßdaten ersichtlich ist, lassen sich die Ferrofluids mit Hilfe eines Magneten im Senkbecken anreichern.

4.3.3. Beeinflußbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder im Kreislaufmodell I

Die Meßergebnisse sind in Tab. 22 wiedergegeben. Die gefundenen Werte für die Extinktion und die Suszeptibilität bei den einzelnen Versuchsreihen mit und ohne Einfluß eines äußeren Magnetfeldes wurden mit Hilfe eines Hewlett-Packard-9820 A-Calculators einem Student-Test für abhängige Stichproben (dependent t-test) unterzogen. Dabei zeigte sich, daß die Meßwerte von Kreislaufversuchen mit und ohne magnetische Beeinflussung in keinem der Fälle für die Grenzen $\pm 0,05$ und auch $\pm 0,01$ signifikant unterschiedlich waren. Wenn auch manche der in Tab. 22 angeführten Meßwerte für die Extinktion oder die Suszeptibilität für eine geringgradige Mehranreicherung unter dem Einfluß des Magnetfeldes zu sprechen scheinen, so muß man doch davon ausgehen, daß diese nicht signifikanten Unterschiede rein zufällig und statistisch nicht reproduzierbar sind. Im Kreislaufmodell I konnte also die Annahme einer magnetischen Beeinflußbarkeit von ferromagnetischen Trägererythrozyten nicht bestätigt werden.

Tab. 22: Meßergebnisse aus den Kreislaufversuchen mit Kreislaufmodell I

Laufstufe der Pumpe	Laufzeit [min]	Art der untersuchten Zellen	Testareal im Kreislaufsystem	Extinktion	Suszeptibilität χ_5 μV
-----	-----	ferromagnetische Trägererythrozyten	-----	-----	2,45
-----	-----	unbeladene Kontrollerythrozyten	-----	-----	0,00
1	30	ferromagnetische Trägererythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,128	0,10
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,105	0,10
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,326	0,00
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,331	0,00
3	20	ferromagnetische Trägererythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,052	0,25
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,080	0,27
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,364	0,00
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,369	0,00
3	20	ferromagnetische Trägererythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,204	0,30
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,233	0,21
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Kapillare A mit Magnetfeld	0,247	0,00
			Kapillare B ohne Magnetfeld	0,245	0,00

Meßgenauigkeit der Extinktion: $\pm 0,008$

Meßgenauigkeit der Suszeptibilität: $\pm 0,03$

Tab. 23: Meßergebnisse aus den Kreislaufversuchen mit Kreislaufmodell II

Laufstufe der Pumpe	Laufzeit [min]	Art der untersuchten Zellen	Testareal im Kreislaufsystem	Extinktion	Suszeptibilität χ_5 μV
-----	-----	ferromagnetische Trägererythrozyten	-----	-----	2,18 *) 3,78
-----	-----	unbeladene Kontrollerythrozyten	-----	-----	0,00
5	15	ferromagnetische Trägererythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,360	0,53
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,583	0,55
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,210	0,00
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,245	0,00
5	15	ferromagnetische Trägererythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,460	0,62
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,565	0,29
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,322	0,00
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,439	0,00
3	20	ferromagnetische Trägererythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,408	0,60
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,466	0,46
		unbeladene Kontrollerythrozyten	Petrischale mit Magnetfeld	0,504	0,00
			Petrischale ohne Magnetfeld	0,490	0,00

*) Zellen aus zwei verschiedenen Präparationen

Meßgenauigkeit der Extinktion: $\pm 0,008$

Meßgenauigkeit der Suszeptibilität: $\pm 0,03$

4.3.4. Beeinflußbarkeit ferromagnetischer Trägererythrozyten durch äußere Magnetfelder im Kreislaufmodell II

Die gefundenen Meßergebnisse aus dieser Versuchsreihe sind in Tab. 23 wiedergegeben. Auch hier muß man nach der statistischen Überprüfung der Daten davon ausgehen, daß sich die Trägererythrozyten durch ein äußeres Magnetfeld nicht signifikant beeinflussen lassen (Student-Test für abhängige Stichproben, beidseitige Grenzen $\pm 0,05$ bzw. $\pm 0,01$).

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der Kreislaufversuche also folgendermaßen beurteilen:

1. In den ersten Minuten nach der Präparation lassen sich größere Ansammlungen von ferromagnetischen Trägererythrozyten (Tropfen einer Zellsuspension) eindeutig durch äußere Magnetfelder beeinflussen und ablenken.
2. Bei den Versuchen, ferromagnetische Trägererythrozyten in verschiedenen In-vitro-Kreislaufmodellen anzureichern ("cell-targeting" im Sinne K. Widders, vgl. [75]), ist kein signifikanter Einfluß äußerer Magnetfelder mehr auf die Zellen nachweisbar. Vor allem bei längeren Kreislaufzeiten scheinen die Zellen im Bereich starker Magnetfelder nicht angereichert, sondern lediglich beschleunigt von den vorher inkorporierten Magnetitpartikeln entleert zu werden, was sich aufgrund der festgestellten hohen Leckströme (vgl. Abschnitt 3.3. dieser Arbeit) bereits vermuten ließ.

5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION ALLER ERGEBNISSE — ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man den derzeitigen Stand der Entwicklung von ferromagnetischen Trägererythrozyten folgendermaßen zusammenfassen:

Mit der von Dale ([10]), DeLoach ([11]) und Sprandel ([61]) angegebenen Methode der hypoosmolaren Dialyse zur Herstellung von beladenen Erythrozytenschatten (Trägererythrozyten) ist es, unter geringen Modifikationen entsprechend den besonderen Verhältnissen bei der Arbeit mit Ferrofluids, möglich, Magnetitpartikel (Fe_3O_4) in Erythrozyten einzuschließen. Dabei bietet die von v. Hörsten ([60]) weiterentwickelte Methode der Suszeptibilitätsmessung über die Bestimmung der Wechselstrom-Impedanz einer Spule eine geradezu ideale Möglichkeit, das Ausmaß dieser Beladung qualitativ und quantitativ zu erfassen.

Die erzielten Beladungsraten liegen im Bereich von 3 % bis 15 % der im Außenmedium zum Einschluß angebotenen Ferrofluidmenge. Zu beachten ist, daß der Einschluß nur mit solchen Ferrofluids gelingt, die reine Suspensionen von Magnetitpartikeln in Aqua dest. ohne jeglichen Zusatz organischer oder anorganischer Lösungsvermittler darstellen. Zur Zeit sind Ferrofluids, die diesen Anforderungen in etwa genügen, vom Hersteller nur als "Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I)" lieferbar. Alle anderen Magnetitaufbereitungen sind im höchsten Grad zytotoxisch und führen in der Mehrzahl der Fälle zur vollständigen Hämolyse der zu beladenden Zellen.

Aber auch beim Einsatz von Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) treten etliche Schwierigkeiten auf. Durch den Verzicht auf Lösungsvermittler bilden die Magnetitpartikel nach einiger Zeit große Konglomerate, welche die Membranporen der Erythrozyten nicht mehr passieren können. Deswegen müssen Ferrofluids vor ihrer Anwendung mit Ultraschall behandelt werden, um so wenigstens für die Zeit des Beladungsvorganges eine mittlere Partikelgröße von etwa $180 \text{ \AA}$ zu gewährleisten. Außerdem zeigen auch Ferrofluids EMG 1111 (BIO-I) eine nicht zu unterschätzende zytotoxische und hämolytische Aktivität, besonders, wenn sie im Außenmedium in höheren Konzentrationen ($> 50 \text{ Vol\%}$) angeboten werden. Dies bestätigen umfangreiche morphologische Studien von Trägererythrozyten nach ihrer Beladung mit Ferrofluids im Rasterelektronenmikroskop,

wo sich in allen Fällen mehr oder weniger schwere Zellschäden zeigen. Da andererseits bei zu geringen Konzentrationen von Ferrofluids im Außenmedium auch die Beladungsraten stark zurückgehen, muß letztlich ein Mittelweg gefunden werden, um eine ausreichende Beladungsrate bei möglichst geringen morphologischen Veränderungen zu erzielen. Eine weitere Schwierigkeit stellt die große Variabilität der Zusammensetzung von Ferrofluids dar, die sich laut Angaben des Herstellers auch in absehbarer Zeit nicht vermeiden lassen wird, und die zu sehr unterschiedlichen Beladungsraten führt, je nach dem, welche Lieferung von Ferrofluids gerade zum Einsatz kommt.

Gleich nach ihrer Beladung sind die ferromagnetischen Trägererythrozyten eindeutig durch ein äußeres Magnetfeld beeinflussbar. Aufgrund massiver Leckströme von Magnetitpartikeln aus den Zellen heraus sinkt die meßbare Suszeptibilität der Trägererythrozyten jedoch innerhalb einer Stunde praktisch wieder auf Null ab, so daß sich von daher auch eine magnetische Beeinflussbarkeit im Kreislaufsystem als unmöglich erweist. Die Ferrofluidverluste finden, wie eindeutig gezeigt werden konnte, auf dem Weg von Defekten in der Erythrozytenmembran statt, welche offensichtlich erst während der Beladungsprozedur mit Ferrofluids entstehen (Zytotoxizität!). Diese Membranläsionen sind zu klein, als daß auch Hämoglobin in nennenswertem Umfang die Zellen verlassen könnte, und sie lassen sich nicht mit Glutaraldehyd abdichten, so daß man die Leckströme auf diese Weise nicht unterbinden kann. Damit sind, trotz ermutigender Anfangserfolge beim Einschluß von Ferrofluids, einer klinischen Anwendung von ferromagnetischen Trägererythrozyten zunächst Grenzen gesetzt.

Ein Teil der oben beschriebenen Probleme ließe sich mit ziemlicher Sicherheit lösen, wenn es gelänge, die Ferrofluids zu "entgiften", d.h. ihre schädigende Wirkung auf die Trägerzellen zu reduzieren. Dann könnten Leckströme, jedenfalls in so großem Umfang wie bisher, wohl verhindert werden, und die Zellen ließen sich dann wahrscheinlich auch im Magnetfeld anreichern, wie dies für ferromagnetische Mikrosphären ja schon lange gelungen ist ([23], [30], [31], [32], [33], [45], [46], [47], [50], [59] u.a.).

Zu fordern ist deshalb zunächst eine intensive Beschäftigung mit den Ferrofluids, um detailliertere Aussagen über ihre Wirkung auf tierische und menschliche Zellkulturen, ihre Pharmakokinetik und ihren Stoffwechsel im Organismus (Abbau, Anreicherung, Ausscheidung) zu erhalten. Es sei hier auf

erste Ergebnisse bezüglich solcher Fragen von Senyei und Widder ([59]) sowie Mosbach und Schroeder ([47]) hingewiesen. Über die allgemeine Zytotoxizität von reinem Magnetit ist aber bisher so gut wie nichts bekannt.

Eine andere Möglichkeit, die Ferrofluids bioverträglicher zu machen, besteht darin, die Magnetitpartikel mit bioverträglichen Hüllen zu umgeben und sie erst so in die Erythrozyten einzuschließen. Auf Anraten des amerikanischen Chef-Chemikers von Ferrofluidics Corporation führten wir folgende Versuchsreihe durch:

Eine 5 g%ige Albuminlösung (100 mg Albumin auf 2,0 ml Puffer I) und eine 25 Vol%ige Ferrofluid-Puffer-Lösung wurden im Verhältnis 1:2 bzw. 1:4 gemischt und anschließend gemeinsam für 60 Sekunden mit 50 kHz ultrabeschallt. Dabei könnte es nach Ansicht des Chemikers zur Ausbildung feiner Albuminmembranen um die Ferrofluids kommen. Anschließend wurden diese "albuminierten" Magnetitpartikel entsprechend der Standardpräparation (Tab. 12, S. 54) zur Beladung von Erythrozyten verwendet. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden die beladenen Zellen wieder hinsichtlich ihrer Suszeptibilität und ihrer Morphologie untersucht. Außerdem wurde in gleicher Weise, wie in Kapitel 3. erläutert, das Ausmaß der Leckströme ermittelt. Auch wurden die Zellen im Kreislaufmodell I getestet.

Auf eine ausführliche Darstellung der Meßergebnisse kann hier verzichtet werden, da man feststellen muß, daß die Inkubation mit Albumin keine Besserung gegenüber den bisher erzielten Resultaten erbrachte. Die Beladungsrate lag auch nach dieser Spezialbehandlung nur zwischen 4,3 % und 12,0 %, die morphologischen Untersuchungen erbrachten maximal einen Anteil von 20 % normal konfigurierten, bikonkaven Zellen. Auch die Leckströme aus den beladenen Trägererythrozyten konnten nicht verringert werden (Verlust der gesamten Suszeptibilität innerhalb einer Stunde) und die Kreislaufversuche zeigten keine signifikante Mehranreicherung der Trägererythrozyten im Bereich von Magnetfeldern.

Wie Ferrofluidics Corporation bestätigte, wird aber derzeit in den USA an einer Weiterentwicklung bioverträglicher Ferrofluids intensiv gearbeitet, so daß man auf die Forschungsergebnisse der nächsten Jahre gespannt sein darf.

Die Beladung von Trägererythrozyten mit Magnetitpartikeln wurde in der vorliegenden Arbeit nicht um ihrer selbst willen untersucht, sondern um eventuell später ein magnetisch gesteuertes "targeting" von Medikamenten zu ermöglichen. Deshalb müßte, ehe man zu endgültigen Aussagen über eine klinische Relevanz dieser Methode kommen kann, in weiteren Versuchsreihen geprüft werden, was passiert, wenn man Erythrozyten gleichzeitig mit Ferrofluids und einem Arzneimittel belädt. Es ist zu erwarten, daß sich das zur Beladung zur Verfügung stehende Zellvolumen dann unter Ferrofluids und Medikament aufteilt, so daß die Beladungsrate für Magnetitpartikel (und somit die magnetische Beeinflußbarkeit der resultierenden Trägererythrozyten) noch geringer sein dürfte, als bei dem hier untersuchten alleinigen Einschluß von Ferrofluids. Es wäre auch denkbar, daß Arzneimittel und Ferrofluids sich gegenseitig beeinflussen und sich als Folge davon die Wirksamkeit des Arzneimittels und/oder die Suszeptibilität der Ferrofluids verändern. Auch könnten die durch Ferrofluids hervorgerufenen Membranveränderungen einen Einschluß von Arzneimitteln in dem Umfang, wie er bisher von Sprandel (z.B. [68]) erreicht wurde, unmöglich machen. Aber nur, wenn beide Substanzen, Ferrofluids und Arzneimittel, gleichzeitig inkorporiert werden können und die Trägererythrozyten dann noch ausreichende Mengen des Arzneimittels transportieren und sich magnetisch steuern lassen, ist eine Fortführung der Forschung in dieser Richtung klinisch sinnvoll.

Die Verwendung ferromagnetischer Trägererythrozyten wäre in Zukunft aber auch noch auf einem ganz anderen Gebiet denkbar, nämlich ihr Einsatz als "Kontrastmittel" zur Gefäßdarstellung bei der ebenfalls mit Magnetfeldern arbeitenden neuen Methode der Kernspintomographie (MNR). Dazu müßten jedoch ebenfalls bioverträglichere Ferrofluids entwickelt werden, um die massiven Leckströme innerhalb kürzester Zeit wirksam einzudämmen. Außerdem wären Studien über den Stoffwechsel der Ferrofluid-Verbindungen und ihre Elimination aus dem menschlichen Körper zu fordern.

Wie aus meinen Ausführungen deutlich wird, haben ferromagnetische Trägererythrozyten also durchaus eine Zukunft. Vor allem wenn es gelingt, die Anfangsschwierigkeiten erfolgreich zu meistern, könnte dieser biologische "carrier" noch einmal eine nicht unerhebliche diagnostische und therapeutische Bedeutung erlangen.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- [1] Akimoto M., Morimoto Y.: Use of magnetic emulsion as a novel drug carrier for chemotherapeutic agents.
Biomaterials 1983 Jan; 4(1): 49 - 51
- [2] Alpert Y., Banerjee R.: Magnetic susceptibility measurements of deoxygenated hemoglobins and isolated chains.
Biochim. Biophys. Acta 1975 Sept; 405(1): 144 - 154
- [3] Baker R.F.: Entry of ferritin into human red cells during hypotonic hemolysis.
Nature 1967; 215: 424 - 425
- [4] Baker R.F.: Ultrastructure of the red blood cell.
Federation Proceedings 1967 Nov - Dec; 26(6): 1785 - 1801
- [5] Baker R.F., Gillis N.R.: Osmotic hemolysis of chemically modified red blood cells.
Blood 1969 Feb; 33: 170 - 179
- [6] Billah M.M., Finean J.B., Coleman R., Michell R.H.: A comparison of hemoglobin-free human erythrocyte "ghosts" prepared under isoionic and hypoionic conditions.
Biochem. Soc. Trans. 1977; 5(4): 1139 - 1140
- [7] Boogard C., Dixon G.H.: Red cell ghost-mediated microinjection of RNA into HeLa cells - I. A comparison of two techniques for the entrapment and microinjection of RNA and mRNA.
Exp. Cell. Res. 1983 Jan; 143(1): 175 - 190
- [8] Boogard C., Dixon G.H.: Red cell ghost-mediated microinjection of RNA into HeLa cells - II. Cellular translations of protamine mRNA; Post-translational modifications and nuclear binding in newly-synthesized protamine.
Exp. Cell. Res. 1983 Jan; 143(1): 191 - 205

- [9] Buchanan J.W., Rhodes B.A., Wagner H.N.Jr.: Labelling albumin microspheres with ^{113m}In .
J. Nucl. Med. 1969 Jul; 10: 487 - 490
- [10] Dale G.L., Villacorte D.G., Beutler F.: High-yield entrapment of proteins into erythrocytes.
Biochem. Med. 1977 Oct; 18(2): 220 - 225
- [11] DeLoach J.R., Ihler G.: A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids.
Biochim. Biophysiol. Acta 1977; 496: 136 - 145
- [12] DeLoach J.R., Harris R.L., Ihler G.M.: An erythrocyte encapsulator dialyser used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghosts.
Anal. Biochem. 1980 Feb; 102(1): 220 - 227
- [13] DeLoach J.R., Barton C., Culler K.: Preparation of resealed carrier erythrocytes and in vivo survival in dogs.
Am. J. Vet. Res. 1981 Apr; 42(4): 667 - 669
- [14] DeLoach J.R., Barton C.: Glutaraldehyde-treated carrier erythrocytes for organ targeting of methotrexate in dogs.
Am. J. Vet. Res. 1981 Nov; 42(11): 1971 - 1974
- [15] DeLoach J.R., Barton C.: Circulating carrier erythrocytes: Slow-release vehicle for an antileukemic drug, cytosine arabinoside.
Am. J. Vet. Res. 1982 Dec; 43(12): 2210 - 2212
- [16] DeLoach J.R., Sprandel U.(eds.): Red blood cells as carriers for drugs.
S. Karger - Verlag, Basel 1985
- [17] Esformes J.: Biological effects of magnetic fields generated with CoSa - magnets.
Bull. Hosp. Joint Dis. 1981; 41: 81 - 87

- [18] Fiddler M.B.: Enzyme therapy XIV: Comparison of methods for enzyme entrapment in human erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med. 1980 Aug; 96(2): 307 - 317
- [19] Gratzer W.B.: The red cell membrane and its cytoskeleton.
Biochem. J. 1981 Jul; 198(1): 1 - 8
- [20] Gregoriadis G., Ryman B.E.: Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases.
Biochem. J. 1971 Oct; 124: 58
- [21] Gregoriadis G., Allison A.C.: Entrapment of proteins in liposomes prevents allergic reactions in pre-immunised mice.
FEBS Lett. 1974 Sept; 45: 71 - 74
- [22] Gregoriadis G.: Targeting of drugs.
Nature 1977 Feb; 265(5593): 407 - 411
- [23] Homma M., Okada M., Minowa T., Kato T., Nemoto R.: An approach to magnetically controlled cancer chemotherapy - II. Theoretical basis on magnetic guide of microcapsules in vascular system.
J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1980 Aug; 15(5): 881 - 884
- [24] Hubbard A.R., Sprandel U., Chalmers R.A.: Transport of oxalic acid, glycollic acid, glyoxylic acid and benzoic acid by resealed erythrocyte ghosts prepared by a dialysis technique.
Biochem. Soc. Trans. 1979 Oct; 7(5): 958 - 960
- [25] Ibrahim A., Couvreur P., Roland M., Speiser P.: New magnetic drug carrier.
J. Pharm. Pharmacol. 1983 Jan; 35(1): 59 - 61
- [26] Ihler G.M., Glew R.H., Schnure F.W.: Enzyme loading of erythrocytes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1973 Sep; 70: 2663 - 2666

- [27] Ihler G.M.: Erythrocytes as carriers for glucocerebrosidase.
Prog. Clin. Biol. Res. 1982; 95: 655 - 667
- [28] Jizuka T., Yonetani T.: Magnetic susceptibility.
Methods Enzymol. 1972; 26 PtC: 682 - 700
- [29] Kanda S., Inoue K., Nojima S.: Resealing of erythrocyte membranes after hypotonic hemolysis.
Jpn. J. Exp. Med. 1979 Aug; 49(4): 251 - 256
- [30] Kato T., Nemoto R., Mori H., Unno K., Goto A., Homma M.:
An approach to magnetically controlled cancer chemotherapy - I. Preparation and properties of ferromagnetic mitomycin C microcapsules.
J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1980 Aug; 15(5): 876 - 880
- [31] Kato T., Nemoto R., Mori H., Iwata K., Sato S., Unno K.,
Goto A., Harada M., Homma M., Okada M., Minowa T.: An approach to magnetically controlled cancer chemotherapy - III. Magnetic control of ferromagnetic mitomycin C microcapsules in the artery.
J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1980 Oct; 15(6): 962 - 966
- [32] Kato T., Nemoto R., Mori H., Iwata K., Sato S., Unno K.,
Murota H., Echigo M., Harada M., Homma M.: An approach to magnetically controlled cancer chemotherapy - IV. Magnetically controlled intravesical instillation of ferromagnetic mitomycin C microcapsules for bladder tumor of the rabbit.
J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1980 Oct; 15(6): 967 - 971
- [33] Kato T., Nemoto R., Mori H., Abe R., Unno K., Goto K., Murota H., Harada M., Kawamura K., Homma M.: An approach to magnetically controlled cancer chemotherapy - V. Preparation, properties and pharmacokinetics of microcapsules encased with magnetic particles and mitomycin C.
J. Jap. Soc. Cancer Ther. 1981 Dec; 16(7): 1351 - 1357

- [34] Ketchen E.E., Porter W.E., Bolton N.E.: The biological effect of magnetic fields on men.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1978 Jan; 39(1): 1 - 11
- [35] Knudson A.G.Jr., Di Ferrante N., Curtis J.E.: Effect of leukocyte transfusion in a child with type II mucopolysaccharidosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1971 Aug; 68: 1738 - 1741
- [36] Kohlrausch F.: Praktische Physik zum Gebrauch für Unterricht, Forschung und Technik (in 3 Bänden).
Taubler-Verlag, Stuttgart 1968, 22. Auflage
- [37] Kondorsky E.J., Norina S.B., Shaligin A.N.: Effect of heterogeneous magnetic field on human erythrocytes.
Biofizika 1980 Mar - Apr; 25(2): 353 - 355
- [38] Kondorsky E.J., Norina S.B., Litvinchuk N.V., Shaligin A.N.: Magnetic susceptibility of single human erythrocytes.
Biofizika 1981 Nov - Dec; 26(6): 1104 - 1106
- [39] Leitmannová A., Stösser R., Glaser R.: Changes in the shape of human erythrocytes under the influence of a static magnetic field.
Acta Biol. Med. Ger. 1978; 36(5-6): 931 - 934
- [40] Li C.K.N., Levine R.P.: Resealability as evidence that the functional complement and osmotic membrane lesions are distinct.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979 Dec; 91(4): 1346 - 1351
- [41] Lieber M.R., Steck Th.L.: A description of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. - Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts.
J. Biol. Chem. 1982 Oct; 257(19): 11651 - 11659 u. 11660 - 11666
- [42] Lynch W.E., Sartino G.P., Ghaffar A.: Erythrocytes as carriers of chemotherapeutic agents for targeting the reticuloendothelial system.
Am. J. Hematol. 1980; 9(3): 249 - 259

- [43] Matas A.J., Sutherland D.E.R., Steffes M.W., Mauer S.M., Lowe A., Simmons R.L., Najarian J.S.: Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats.
Science 1976 May; 192(4242): 892 - 894
- [44] Meyers P.H., Cronin F., Nice C.M.Jr.: Experimental approach in the use and magnetic control of metallic iron particles in the lymphatic and vascular system of dogs as a contrast and isotopic agent.
Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med. 1963 Nov; 90: 1068 - 1077
- [45] Morimoto Y., Sugibayashi K., Okumara M., Kato Y.: Biomedical applications of magnetic fluids - I. Magnetic guidance of ferro-colloid-entrapped albumin microsphere for site specific drug delivery in vivo.
J. Pharm. Dyn. 1980 May; 3(5): 264 - 267
- [46] Morimoto Y., Sugibayashi K., Okumara M., Kato Y.: Biomedical applications of magnetic fluids - II. Preparation and magnetic guidance of magnetic albumin microsphere for site specific drug delivery in vivo.
J. Pharm. Dyn. 1981 Aug; 4(8): 624 - 631
- [47] Mosbach K., Schroeder U.: Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs.
FEBS Lett. 1979 Jun; 102(1): 112 - 116
- [48] Neerunjun E.D., Gregoriadis G.: Tumor regression with liposome - entrapped asparaginase: some immunological advantages.
Biochem. Soc. Trans. 1976 Jan; 4(1): 133 - 134
- [49] Ohno H., Shimidzu N., Tsuchida E., Sasakawa S., Honda K.: Fluorescence polarisation study on the increase of membrane fluidity of human erythrocyte ghosts induced by synthetic water - soluble polymers.
Biochim. Biophys. Acta 1981 Dec; 649(2): 221 - 228

- [50] Ovadia H.: Magnetic microspheres: Factors influencing localization at different anatomical sites in rats.
Isr. J. Med. Sci. 1983 Jul; 19(7): 631 - 637
- [51] Papahadjopoulos D., Poste G., Mayhew E.: Cellular uptake of cyclic AMP captured within phospholipid vesicles and effect on cell-growth behaviour.
Biochim. Biophys. Acta 1974 Sep; 363(3): 404 - 418
- [52] Ponder E.: Method for determining form of distribution of red cell resistances to simple hemolysis.
Blood 1948 May; 3: 556 - 565
- [53] Raap A.K., Van Duijn P.: Enzyme-incorporated erythrocyte ghosts: a new model system for quantitative cytochemistry.
J. Histochem. Cytochem. 1981 Dec; 29(12): 1418 - 1424
- [54] Rhodes B.A., Wagner H.N.Jr.: Improved lung scans using ^{99m}Tc-albumin-microspheres.
J. Nucl. Med. 1969; 10: 432
- [55] Rumsby M.G., Sparrow S., Little C.: The oleic acid-induced shape transformation of human erythrocytes
Biochem. Soc. Trans. 1979 Oct; 7(5): 922 - 924
- [56] Schlegel R.A., Rechsteiner M.C.: Red cell-mediated microinjection of macromolecules into mammalian cells.
Methods Cell Biol. 1978; 20: 341 - 354
- [57] Seeman P.: Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin.
J. Cell. Biol. 1967; 32: 55 ff.
- [58] Senyei A.E., Widder K.J.: Magnetic guidance of drug carrying microspheres.
J. Appl. Phys. 1978; 49: 3578 - 3583

- [59] Senyei A.E., Widder K.J.: Drug targeting: magnetically responsive albumin microspheres - a review of the system to date. *Gynecol. Oncol.* 1981 Aug; 12(1): 1 - 13
- [60] Söffge F., von Hörsten W.: AC - susceptibility measurements in small fields on fine superparamagnetic nickel particles. *Z. Phys. B. - Condensed Matter* 1981; 42: 47 - 55
- [61] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: In vitro studies on resealed erythrocyte ghosts as protein carriers. *Res. Exp. Med. (Berlin)* 1979; 175(3): 239 - 245
- [62] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: Transport of uric acid and L-phenyl-alanine by resealed erythrocyte ghosts prepared by a dialysis technique. *Biochem. Soc. Trans.* 1979 Oct; 7(5): 957 - 958
- [63] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: Membrane transport in resealed hemoglobin-containing human erythrocyte "ghosts" prepared by a dialysis procedure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979 Nov; 91(1): 79 - 85
- [64] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: In vivo life span of erythrocyte ghosts as carrier for pharmaka. *Res. Exp. Med. (Berlin)* 1980; 177(1): 13 - 17
- [65] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: Towards enzyme therapy using carrier erythrocytes. *J. Inher. Metab. Dis.* 4(1981): 99 - 100
- [66] Sprandel U., Clark J.B., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: Morphology of hemoglobin containing human erythrocyte ghosts. *Micron* 1981; 12: 29 - 36
- [67] Sprandel U., Hubbard A.R., Chalmers R.A.: Carrier erythrocytes: a novel carrier system for therapeutic agents. *Science* submitted 1984

- [68] Sprandel U.: Verwendung von Erythrozyten als zelluläre Träger für Enzyme exogenen Ursprungs: Vorversuche in vitro und in vivo für die Enzymtherapie angeborener Stoffwechselstörungen. Habilitationsschrift, München 1984
- [69] Sprandel U., Zöllner N.: Osmotic fragility of drug carrier erythrocytes. Res. Exp. Med. (Berlin) 1985; 185(2): 77 - 85
- [70] Sugibayashi K., Okumura M., Morimoto Y.: Biomedical applications of magnetic fluids - III. Antitumor effect of magnetic albumin microsphere-entrapped adriamycin on lung metastasis of AH 7974 in rats. Biomaterials 1982 Jul; 3(3): 181 - 186
- [71] Tyrrell D.A., Ryman B.E.: The entrapment of therapeutic agents in resealed erythrocyte "ghosts" and their fate in vivo. Biochem. Soc. Trans. 1976; 4(4): 677 - 680
- [72] Wheeler K.P.: Aminoacid transport by resealed ghosts from pigeon erythrocytes. Biochem. J. 1982 Mar; 202(3): 613 - 621
- [73] Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G.: Magnetic microspheres: a model system of site specific drug delivery in vivo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1978 Jun; 158(2): 141 - 146
- [74] Widder K.J., Flouret G., Senyei A.E.: Magnetic microspheres: Synthesis of novel parenteral drug carrier. J. Pharm. Sci. 1979 Jan; 68(1): 79 - 83
- [75] Widder K.J., Senyei A.E., Ranney D.F.: Magnetically responsive microspheres and other carriers for the biophysical targeting of antitumor agents. Advances in Pharmacology and Chemotherapy 1979; 16: 213 - 271

- [76] Widder K.J., Senyei A.E., Sears B.: Experimental methods in cancer therapeutics.
J. Pharm. Sci. 1982 Apr; 71(4): 379 - 387
- [77] Zimmermann U.: Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 2326161 vom 23.05.1973
- [78] Zimmermann U., Pilwat G., Riemann F.: Preparation of erythrocyte ghosts by dielectric breakdown of the cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta 1975 Jan; 375(2): 209 - 219
- [79] Zimmermann U., Riemann F., Pilwat G.: Enzyme loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown.
Biochim. Biophys. Acta 1976 Jun; 426(2): 460 - 474

DANKSAGUNGEN

Allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank sagen:

Herrn Prof. Dr. Zöllner, Vorstand der Medizinischen Poliklinik der Ludwig Maximilians-Universität München, für die freundliche Überlassung des Themas,

Herrn Priv.-Doz. Dr. Sprandel, Chefarzt der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Marktoberdorf, für sein immer offenes Ohr für meine Vorschläge, seine hilfreichen Hinweise und seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion der Versuchsergebnisse,

Herrn Prof. Dr. Stierstadt von der Sektion Physik der Ludwig Maximilians-Universität München für die Ermöglichung der Suszeptibilitätsmessungen in den Räumen seines Instituts,

Herrn Dr. von Hörsten von der Sektion Physik der Ludwig Maximilians-Universität München für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Suszeptibilitätsmessungen,

Herrn Prof. Dr. Wetzstein und Herrn Prof. Dr. Lange von der Anatomischen Anstalt der Ludwig Maximilians-Universität München für ihre Bereitschaft, mir das Rasterelektronenmikroskop in den Räumen ihres Instituts für die morphologischen Studien an Trägererythrozyten zur Verfügung zu stellen,

Herrn Dr. Wagner und seinem wissenschaftlichen Assistenten Herrn Schulz vom Institut für Organische Chemie der Ludwig Maximilians-Universität München für die Durchführung der chemischen Analyse der Ferrofluids,

der medizinisch-technischen Assistentin Frau de Buhr für die gute Einarbeitung in die Präparationstechniken von Trägererythrozyten

und Herrn Hofmann vom Institut für Physiologie und Physiologische Chemie der Ludwig Maximilians-Universität München für die Ausführung der Photoarbeiten.

LEBENS LAUF

Name: Dierk - Joachim Karl Lanz
geboren am: 27. Februar 1959
Geburtsort: Erlangen
Wohnort: Ingolstadt
Konfession: röm.-kath.
Eltern: Dr. Walter Lanz, Arzt für Dermatologie
Dr. Maria Lanz, geb. Pietsch, prakt. Ärztin

Schulbildung:

Volksschule: 1965 - 1969: Volksschule auf der Schanz in Ingolstadt
Gymnasium: 1969 - 1978: Neusprachlicher Zweig des Reuchlin-Gymnasiums in Ingolstadt
Abitur: 29. Juni 1978

Medizinstudium:

Beginn des Studiums: Wintersemester 1978/79 an der Ludwig Maximilians-Universität in München
Ärztliche Vorprüfung: 6. August 1980 in München
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 27. August 1981 in München
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 20. März 1984 in München
Praktisches Jahr: April 1984 - März 1985
- 1. Trimester: Klinikum Ingolstadt (Innere Medizin)
- 2. Trimester: Kreiskrankenhaus Starnberg (Chirurgie)
- 3. Trimester: Friedrich-Baur-Institut der LMU München (Neurologie)
3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 16. April 1985 in München
Approbation: 26. April 1985
Beginn der Dissertation: September 1982

Tätigkeit nach dem Studium:

Seit August 1985 Ableistung des Wehrdienstes als Stabsarzt an der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr in München

